

Fachbereich Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
Fachrichtung Tierhygiene

ZUR METHODIK DER MIKROBIOLOGISCHEN MISCHFUTTERMITTEL-
UNTERSUCHUNG

DER EINFLUß EINES EINFACHEN AUFSCHWEMMENS UND STEHEN-
LASSENS EINER FUTTERPROBE VOR DEM SCHÜTTELN
AUF DIE SCHÜTTELNOTWENDIGKEIT UND DEN KEIMNACHWEIS

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Wolf-Dieter Bielan
Tierarzt aus Mähr.-Ostrau

Berlin 1973
Journal-Nr. 827



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550808_0023

ZUR METHODIK DER MIKROBIOLOGISCHEN MISCHFUTTERMITTEL-
UNTERSUCHUNG

DER EINFLUß EINES EINFACHEN AUFSCHWEMMENS UND STEHEN-
LASSENS EINER FUTTERPROBE VOR DEM SCHÜTTELN
AUF DIE SCHÜTTELNOTWENDIGKEIT UND DEN KEIMNACHWEIS

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Wolf-Dieter Bielan
Tierarzt aus Mähr.-Ostrau

Berlin 1973
Journal-Nr. 827

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin



Vorsitzender:	Prof. Dr. H.-J. Sinell
Referent:	Prof. Dr. H. G. Milliger
Korreferent:	Prof. Dr. F. Untermann

Tag der Promotion:	11. Juli 1973
--------------------	---------------

1918

1918

1918

1918

1918

Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

1918

1918

1918

1918

1918

1918

1918

1918

1918

1918

Inhaltsübersicht

	<u>Seite</u>
I. LITERATUR	3
A. Sinn und Wert der mikrobiologischen Futtermitteluntersuchung	3
B. Methodische Fragen bei der mikrobiologischen Untersuchung	7
1. Die Schütteldauer	9
2. Die Absetzzeit	12
3. Die Stehzeit (Einweichzeit)	13
C. Die Reproduzierbarkeit der Befunde	15
II. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	17
A. Material und Methoden	19
1. Das untersuchte Futter	19
2. Die Versuchstechnik	20
3. Zählung und Bewertung	23
B. Ergebnisse	24
1. Ermittlung des Plateaus des Keim- nachweises	24
2. Einfluß verschiedener Absetzzeiten auf die nachweisbare Gesamtkeimzahl	28
3. Einfluß verschiedener Stehzeiten (Einweichzeiten) auf die nachweis- bare Gesamtkeimzahl	32
III. DISKUSSION	37
A. Die Reproduzierbarkeit der Befunde bei Mehrfachuntersuchungen	37
B. Der Einfluß der Stehzeit	39
IV. ZUSAMMENFASSUNG	48
V. LITERATURVERZEICHNIS	49

I. L I T E R A T U R

A. Sinn und Wert der mikrobiologischen Futtermittel- untersuchung

Bei der Futtermittelmikrobiologie handelt es sich um einen relativ alten Forschungszweig der angewandten Bakteriologie und Mykologie. Schon in der frühen Futtermittel-Literatur galt das Interesse der Frage, ob die Ergebnisse der mikrobiologischen Futtermitteluntersuchungen geeignet sind, ein Urteil über den Frischzustand eines Futters zu finden. EMMERLING 1899 versuchte mit einer "Schimmelprobe" die Frische des Futters zu bestimmen. 1890 vertrat er die Auffassung, daß bei Pilzfreiheit eines Futters immer eine ausgezeichnete Qualität zu beobachten sei. Seine von ihm dazu empfohlene Untersuchungsmethode der "Schimmelprobe" konnte sich aber nicht durchsetzen. Sie wurde von mehreren Autoren, wie KRÜGER und STEFFECK 1900, SOXLETH 1900 und GORDAN 1904, als unzuverlässig bezeichnet.

HONCAMP und Mitarb. 1932 fassen bei ihren Futteruntersuchungen ihre Erfahrungen dahingehend zusammen, daß die ermittelten Keimzahlen und die Art der gefundenen Keime einen Rückschluß auf den Frischzustand des Futters erlauben. RINCKLEBEN und BARTRAM 1943 sind der Ansicht, daß neben der chemischen und botanisch-mikroskopischen Untersuchung, die bakteriologische Prüfung ein wichtiges Hilfsmittel ist, den Gesundheitszustand eines verdächtigen Futtermittels festzustellen. CLAUS 1941 spricht sich gegen einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen Bestimmung der Bakterienzahl und Frischzustand eines Futters aus. Er meint, bei Futtermitteln pflanzlicher Herkunft erlaubt die Bestimmung der Bakterienzahl keinen sicheren Rückschluß auf den Frischzustand. Lediglich bei Futtermitteln tierischen Ur-

sprungs sei die Gesamtkeimzahl geeignet, Aussagen über die Frische zu machen.

Mikrobiologische Futteruntersuchungen haben in den letzten Jahren mit der Entwicklung einer Mischfuttermittelindustrie wieder ein verstärktes Interesse gefunden.

Ab 1956 untersucht SPICHER in einer Reihe von Arbeiten die Mikroflora des Getreides. 1958 befaßt er sich eingehend mit dem Einfluß der Umweltfaktoren auf die Zusammensetzung der Mikroflora. SPICHER 1962 meint, daß aus der Kenntnis des Umfanges und der Art der mikrobiellen Verunreinigung Anhaltspunkte für die Bewertung der Qualität des Getreides und der Getreideprodukte zu gewinnen sind. SPICHER 1962 erweitert den Ausdruck "Frischezustand" zu "sogenannter Frische". 1963 gibt SPICHER eine systematische Übersicht der Bakterienflora des Getreides und macht auf die lückenhafte Kenntnis über Vorkommen und Bedeutung der verschiedenen Bakterien aufmerksam. Er stellt fest, daß, solange die Komponenten der Mikroflora nicht genau anzusprechen sind, keine genauen Rückschlüsse auf ihre Bedeutung und ihre möglichen Auswirkungen auf die Qualität des Getreides zu erwarten sind.

SCHMIDT 1963 macht für die Qualitätsminderung und für den Verderb der Futtermittel in erster Linie Mikroorganismen und die von ihnen hervorgerufenen Abbauprodukte verantwortlich und ist der Ansicht, daß die Ermittlung des "mikrobiologischen Status" eine praktische Bedeutung für den sogenannten Frischezustand habe. 1968 gibt SCHMIDT die Anregung, von dem Begriff "Frischezustand" abzugehen, da die "Frische" eine labile Futtereigenschaft ist, die über kürzere oder längere Zeiträume hin verloren geht. Man sollte darum besser vom "Frischegrad" eines Futtermittels sprechen, um damit auszudrücken, daß es außer dem Zustand des Frischseins eine Reihe von nachgeordneten Stadien gibt, die stufenweise zum Verderb hinüberleiten. SCHMIDT

schlägt vor, jeder Untersucher sollte sich bei der Beurteilung des Frischegrades auf einheitlich gewonnene Unterlagen stützen, damit eine möglichst gleichmäßige Bewertung der Handelsfuttermittel durch verschiedene Untersucher möglich ist.

SPICHER 1967 diskutiert die Bedeutung der "Gelbkeime" und Pilze für die Beurteilung der Qualität des Getreides. Wie auch SCHMIDT 1965 sieht SPICHER die "Gelbkeime" als besonders typisch für gesunde Getreideprodukte an.

HILLIGER 1969 sieht in der bakteriologischen Futtermitteluntersuchung zwei Hauptaufgaben: 1. Urteilsbildung über den sogenannten "Frischezustand" eines Futtermittels. 2. Urteilsbildung über das Freisein von Krankheitserregern. HILLIGER 1969 regt an, den Ausdruck "Frischezustand" durch den Begriff "allgemeiner mikrobiologischer Zustand" mit den Wertstufen "schwach keimhaltig", "durchschnittlich keimhaltig" und "stark keimhaltig" zu ersetzen. Er schlägt vor, diese Befundangabe bei der bakteriologischen Untersuchung als Teil der Gesamtuntersuchung des Futters anzusehen, da ihre Aussagekraft für den hygienischen Wert des Futters ohne weitere Untersuchung gering ist. Weiterhin sollte die Prüfung auf Freisein von Krankheitserregern unter den Begriff "spezieller mikrobiologischer Zustand" gestellt werden. HILLIGER fordert im besonderen für die Untersuchungsmethodik zur Prüfung des "allgemeinen mikrobiologischen Zustandes" eine Vereinheitlichung der Technik.

Mit der Gesamtkeimzahlbestimmung von pelletierten Futtermitteln befaßt sich m.W. zum ersten Mal SCHMIDT 1967. Ihm folgen eine Reihe von Autoren (HÖRTER 1968, 1969, 1972; HÖRTER und KLEIN 1969; Juhr und OBI 1970; JUHR und GRUBER 1971), die in Übereinstimmung eine starke Verminderung der Gesamtkeimzahl und auch eine Verschiebung der nachweisbaren Keimarten gegenüber mehl-

artigen Futtermitteln feststellen. Die Bedeutung dieser Untersuchungen nahm mit dem Aufbau der Zucht und Haltung von SPF-Tieren zu. Zu den Kriterien für die Beurteilung von Futtermitteln, die bei SPF-Tieren verwendet werden sollen, äußern sich in letzter Zeit HÖRTER 1968, HILLIGER 1969 sowie JUHR und GRUBER 1971.

GEDEK 1973 spricht vom "mikrobiellen Verderb" von Futtermitteln, der gekennzeichnet ist durch einen bestimmten Keimbefall und die Anhäufung von Produkten des Bakterien- und Pilzstoffwechsels. Nach GEDEK verändert nicht nur das zahlenmäßige Vorkommen von Mikroorganismen den Frischegrad eines Futters, sondern auch die "systematische Zugehörigkeit der dominant darin anzutreffenden Bakterien." GEDEK stellt dar, daß Mikroorganismen in Futtermitteln in der Lage sind, wenn auch auf andere Art und Weise als die Erreger von Infektionskrankheiten, innerhalb eines Warmblutorganismus eine krankmachende Wirkung zu entfalten.

Dieser Literaturüberblick zeigt, daß ein erhebliches Interesse besteht, die hygienische Qualität eines Futtermittels zu kennzeichnen. Es besteht zu Recht die Meinung, daß die mikrobiologische Untersuchung dazu einen beachtlichen Beitrag leisten kann. Die praktische Brauchbarkeit der mikrobiologischen Untersuchung ist zur Zeit sowohl durch sehr unterschiedliche und oft unklare Begriffe als auch durch unbefriedigende Untersuchungstechniken stark eingeschränkt. Bezüglich der Untersuchungstechnik wird auf den folgenden Abschnitt verwiesen. Hinsichtlich der Begriffe erscheint es mir notwendig, künftig mit größerem Nachdruck bei der mikrobiologischen Futtermitteluntersuchung zu unterscheiden einerseits zwischen dem Objekt der Untersuchung und andererseits zwischen dem Ziel der Untersuchung. Beim Objekt ist zu unterscheiden zwischen der Untersuchung der Bakterien
der Pilze

der Toxine und
der Viren.

Das Ziel der Untersuchungen kann sein

- a. eine einfache allgemeine quantitative Aussage
- b. eine gruppenorientierte quantitative und qualitative Aussage
- c. eine selektive und damit spezielle quantitative und qualitative Aussage.

Eine sinnvolle Bewertung mikrobiologischer Befunde in Hinblick auf die hygienische Qualität eines Futtermittels benötigt stets die Ergänzung durch andere Untersuchungen. Im besonderen sind dies organoleptische, mikroskopische und chemische Untersuchungen. Die Absicht, die Frische oder den Frischegrad eines Futtermittels allein auf Grund mikrobiologischer Befunde beurteilen zu wollen, verkennt m.E. die Komplexität der Faktoren, die zum Verderb hinüberleiten.

In der vorgelegten Arbeit beschränkte ich mich auf die Untersuchungen von Bakterien mit dem Ziel einer einfachen allgemeinen quantitativen Aussage.

B. Methodische Fragen bei der mikrobiologischen Untersuchung

Der Wert aller mikrobiologischen Befunde ist von der Qualität der Untersuchungsmethode abhängig. Das gilt im besonderen Maße für die Futtermitteluntersuchung. In letzter Zeit weisen besonders SPICHER 1962 und 1967, SCHMIDT 1963 und 1965 und WERNERY 1971 darauf hin, daß die Untersuchungstechnik einen erheblichen Einfluß auf das Ergebnis solcher Untersuchungen nimmt. Für die gestellte Aufgabe wird die Literaturübersicht über den Einfluß der Methodik auf das Ergebnis der mikrobiologischen Untersuchungen auf die Frage der Ermittlung der Gesamtkeimzahl der Bakterien beschränkt.

Der Begriff "Gesamtkeimzahl" ist kürzlich im Bereich der hygienischen Wasseruntersuchung von HABS und Mitarb. 1972 zur Diskussion gestellt worden. Diese Autoren meinen, daß dieser Terminus den Eindruck erweckt, daß es mit einfachem routinemäßigem Aufwand möglich ist, die tatsächliche Gesamtkeimzahl zu bestimmen. Beim Sachkundigen gibt es keinen Zweifel, daß die ermittelte "Gesamtkeimzahl" diesem absoluten Anspruch nicht gerecht werden kann. Eine Begrenzung ergibt sich im besonderen aus der Art des Nährmediums, aus der Höhe der Bebrütungstemperatur, aus der Länge der Bebrütung und aus der mechanischen Schwierigkeit, zusammenhaftende Mikroorganismen aus ihrem Verband bis zur absoluten Vereinzelung herauszulösen. In den "Deutschen Einheitsverfahren zur Wasseruntersuchung" wurde daher kürzlich der Ausdruck "Gesamtkeimzahl" durch den Ausdruck "Koloniezahl" ersetzt. Auf die mikrobiologische Futtermitteluntersuchung können diese Überlegungen sinngemäß übertragen werden. Es wäre daher überlegenswert, ob auch bei der Futtermitteluntersuchung der Begriff der "Keimzahl" bzw. der "Gesamtkeimzahl" durch den Begriff der "Koloniezahl" künftig ersetzt werden sollte.

WERNERY 1971 stellte kürzlich die Literatur über die Kenntnisse der Faktoren zusammen, die das Ergebnis der Gesamtkeimzahlbestimmung beeinflussen. Dabei unterteilt er in futtergebundene und untersuchungstechnische Faktoren. Die Einflüsse der Untersuchungstechnik gliedert WERNERY in drei Punkte:

1. Einflüsse durch die Aufbereitung
2. Einflüsse durch die Kulturanlage und Bebrütung
3. Einfluß der Auswerttechnik

Er referiert im besonderen die Literatur über den Einfluß der Art der Suspensionstechnik, der Schüttelart, Schütteldauer, Schütteltemperatur, Reibungsmittel, Absetzzeit, Pipettier- und Verdünnungstechnik, Art des Kulturmediums, Zahl der angelegten Parallelplatten, Be-

impfungstechnik sowie der Bebrütungstemperatur und -dauer.

Aufgrund der ausführlichen Darlegungen des gegenwärtigen Standes der Kenntnisse durch WERNERY wurde in der vorgelegten Arbeit darauf verzichtet, die genannten Einflußfaktoren der Untersuchungstechnik auf das Ergebnis der Gesamtkeimzahl erneut im Sinne eines allgemeinen Überblicks zu referieren, zumal sich der Kenntnisstand zwischenzeitlich kaum verbessert hat. Die folgenden Ausführungen beschränken sich daher auf die Faktoren, die in der vorgelegten Arbeit direkt angesprochen werden. Es sind dies die Schütteldauer, die Absetzzeit und die Stehzeit (Einweichzeit).

1. Die Schütteldauer

Um die Mikroorganismen von den Futterpartikeln abzulösen und in der Suspensionsflüssigkeit gleichmässig zu verteilen, ist es üblich, die angesetzte Probe zu schütteln. SPICHER 1962 referiert die bisher angewandten Methoden zur Ermittlung des Bakterienkeimgehaltes von Getreide und stellt fest, daß im allgemeinen Schüttelzeiten zwischen 2 und 20 min empfohlen werden. SPICHER 1962 weist mit eigenen Untersuchungen darauf hin, daß keine der in der Praxis angewandten Schüttelzeiten ausreicht, um die Gewähr für eine weitestgehende Erfassung aller vorhandenen Keime zu geben. Er schüttelt 10 verschiedene Muster über 1, 10, 20 und 40 min und kommt zu dem Ergebnis, daß bei Getreide die Keimzahl auch bei 40 min Schüttelzeit noch ansteigt. Bei Mehlen wird durch Schütteln der Suspension für 20 min noch nicht einmal die Hälfte der vorhandenen Keime für die Keimzahlbestimmung erfaßt.

SCHMIDT 1963 spricht sich dafür aus, die eingewogene Futtermittelprobe nicht länger als 15 - 20 min zu sus-

pendieren, da bei dem Nährstoffreichtum das Bakterienwachstum rasch einsetzen kann. Die ARBEITSGEMEINSCHAFT FÜR GETREIDEFORSCHUNG 1964 gibt eine Schütteldauer von 20 min an.

WERNERY 1971 stellt an mehlartigen Mischfuttermitteln fest, daß die Zahl der nachweisbaren Keime mit der Länge der Schütteldauer bis zu 120 min ansteigt. Danach bildet sich ein Keimnachweisplateau, das mindestens 6 Stunden erhalten bleibt. Diesen Befund erläutert die Abbildung 1. WERNERY interpretiert die Entstehung des Keimnachweisplateaus dahingehend, daß durch das Schütteln bis 120 min immer mehr Keime von den Futterpartikeln abgelöst werden und in die Suspensionsflüssigkeit übergehen. Nach 120 min Schüttelzeit scheinen alle ablösbaren Keime in die Suspensionsflüssigkeit übergegangen zu sein. Daraus resultiert bei weiterer Schüttelverlängerung bis zu 240 min ein etwa gleichbleibender Keimnachweis.

WERNERY und HILLIGER 1973 bestätigen diese Befunde mit einem mehlartigen Futtermittel anderer Zusammensetzung. Ihre Ergebnisse über den Einfluß der Schütteldauer stehen hinsichtlich der Anstiegstendenz und hinsichtlich der Ausbildung eines Nachweisplateaus in Übereinstimmung mit den Angaben von WERNERY. Ein Unterschied liegt lediglich in der notwendigen Schüttelzeit bis zum Erreichen der Nachweisplateaus. Das Plateau läßt sich bei ihnen nach einer Schüttelzeit von 60 - 90 min darstellen und bleibt längere Zeit, mindestens für die Dauer von 2 Stunden, erhalten. Sicher nehmen die Art und Vermahlung der Inhaltsstoffe und die Zusatzstoffe (z.B. Antibiotika) auf Einzelheiten der Plateaubildung Einfluß, so daß es nach dem bisherigen Stand der Kenntnisse noch nicht möglich ist, für das Erreichen des Plateaus eine dem Einzelfall entsprechende Mindestschüttelzeit für Mischfuttermittel anzugeben.

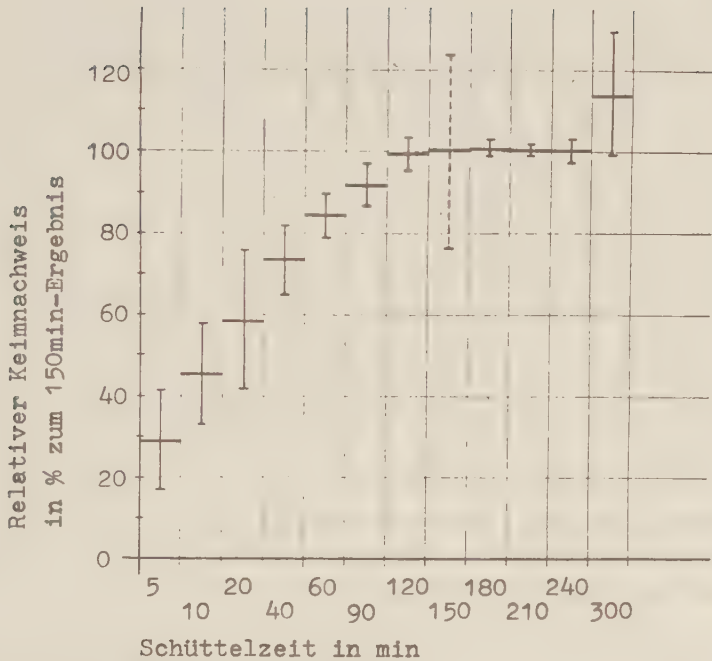


Abb. 1: Einfluß der Schütteldauer auf die nachweisbare Keimzahl nach WERNERY 1971. Ergebnisse in relativer Darstellung, wobei die nachgewiesene Keimzahl nach einer Schüttelzeit von 150min gleich 100% gesetzt ist. Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 12 Versuchsansätzen

In der Literatur finden sich neben Angaben über die Zunahme der Keimzahlen durch Verlängerung der Schüttelzeiten auch einige Angaben über die Abnahme von Keimzahlen bei Verlängerung der Schüttel- bzw. Flüssigkeitseinwirkungszeiten. Solche Beobachtungen wurden auch auf dem Gebiet der Bodenmikrobiologie veröffentlicht. FURNESS 1952 berichtet, daß beim Schütteln einer E.coli-Suspension in destilliertem Wasser mit Glasperlen bzw. mit Glasbruch die Keimzahl umso stärker vermindert wird, je länger das Schütteln dauert und je grösser die als Reibungsmittel benutzten Glasperlen sind. HIRTE 1962 beobachtete an Bodenproben, die er in einer Natriumpyrophosphatlösung oder in Leitungswasser aufschwemmte, daß die Keimzahl durch Schütteln bis zu 30 min ansteigt; bei weiterer Schüttelverlängerung dagegen kommt es wieder zu einem Abfall der Keimzahl. SPICHER 1967 beschreibt ebenfalls eine Verminderung des Überlebens von Keimen von Roggen und Weizen. Er prüfte bis zu einer Verweilzeit von 120 min und stellte fest, daß der Grad des Absterbeeffektes von der Art der Suspensionsflüssigkeit abhängt. Bei Benutzung von Aqua dest. und von Leitungswasser fällt der Anteil der überlebenden Keime schon nach 60 min auf unter 50 %, bei Natriumpyrophosphat lediglich auf etwa 70 bis 90 %. Bei Pepton-NaCl-Lösung dagegen läßt sich binnen 2 Stunden kein deutlicher Absterbeeffekt nachweisen. Man gewinnt den Eindruck, daß die Angaben der Literatur über Absterbeeffekte mehr eine Frage des Suspensionsmittels sind, als daß es sich um ein allgemeines stets einzukalkulierendes biologisches Phänomen handelt.

2. Die Absetzzeit

Unter Absetzzeit wird nach BERNERY 1971 die Zeit verstanden, die zwischen der Schüttelunterbrechung bzw. dem

Schüttelende und der Flüssigkeitsentnahme zur kulturellen Verarbeitung liegt. Bis auf WERNERY konnten in der einschlägigen Literatur keine Angaben über den Einfluß der Absetzzeit auf das mikrobiologische Ergebnis gefunden werden. WERNERYs Untersuchungsergebnisse verdeutlichen die Abhängigkeit des Einflusses der Absetzzeit von der Schütteldauer. Sie zeigen, daß nach einer Schüttelzeit von nur 20 min und bei einer sehr kurzen Absetzzeit (15 sek) regelmäßig die höchsten Keimzahlen nachzuweisen waren. Mit der Verlängerung der Absetzzeit sank die nachgewiesene Keimzahl ab und veränderte sich nach einer Absetzzeit von 5 min nur noch unwesentlich. Dagegen wurde nach einer Schüttelzeit von 150 min die höchste Keimzahl erst nach 10 min Absetzzeit erreicht. WERNERY gibt für diese offensichtlich gegensätzliche Reaktion eine "sedimentier-technisch-mechanische" Erklärung: Wird eine Futterprobe nur kürzere Zeit geschüttelt, so befinden sich in der Suspension noch an den Futterpartikeln haftende Mikroorganismen und Keimagglomerate. Mit der Länge der Absetzzeit sedimentieren nach kurzer Schütteldauer Keimagglomerate und keimtragende Futterpartikel, sammeln sich als Bodensatz an und entziehen sich damit dem Nachweis. Erst nach 2 Stunden Schütteldauer ist zu erwarten, daß die Mehrzahl der Mikroorganismen im Zustand der Ablösung und der Einzellagerung in der Suspensionsflüssigkeit für längere Zeit schwebefähig bleiben und sich so nachweisen lassen.

Da die Befunde von WERNERY meines Wissens noch nicht von anderen Autoren überprüft worden sind, erscheint es mir notwendig, die Frage der Absetzzeit in meine Untersuchungen miteinzubeziehen.

3. Die Stehzeit (Einweichzeit)

Die Stehzeit ist die Zeit, die zwischen dem Ansatz der Futtersuspension und dem Beginn des Schüttelvorgangs

liegt. Dabei wird die eingewogene Futtermenge in eine Steilbrustflasche verbracht und mit der Suspensionsflüssigkeit übergossen. Die Keimsuspension bleibt nun eine frei gewählte Zeit lang bei Zimmertemperatur stehen und gelangt anschließend zur Schüttelung.

Experimentell begründete Kenntnisse über die Möglichkeit und den Grad der Ersetzbarkeit der Schüttelzeit durch die Stehzeit bei der Keimzahlbestimmung von Mischfuttermitteln liegen bisher noch nicht vor. Lediglich HORTER und KLEIN 1969 empfehlen bei pelletiertem Mischfutter die zu untersuchenden Proben 2 bis 5 Stunden in Pepton-NaCl-Lösung durch Einweichen zum Zerfall der Pellets zu bringen und danach weiterzuverarbeiten. Sie machen dabei die Erfahrung, daß die Keimzahlen mehr oder weniger erheblich ansteigen, wenn die Futtermittel ca. 2 Stunden in einem Suspensionsmittel verbleiben. Wird die Verweildauer bis 5 Stunden verlängert, treten keine signifikanten Veränderungen der Keimzahlen gegenüber den Werten nach 2 Stunden auf. Nach HORTER und KLEIN finden anscheinend nach 2 Stunden eine vollständige Aufweichung und Lösung des gesamten Materials statt, ohne daß sich die Keime vermehren. Eine Einweichzeit von 2 bis 5 Stunden scheint in dieser Hinsicht optimale Ergebnisse zu liefern. Die Befürchtung, daß in dieser Zeit eine Vermehrung der Bakterien eintreten könnte, ließ sich nicht bestätigen.

Nachdem für verschiedene Mischfutterarten Untersuchungen vorliegen, die zeigen, daß bei der Keimzahlbestimmung für optimale Ergebnisse die zur Aufbereitung notwendige Schüttelzeit etwa auf 2 Stunden verlängert werden muß, können sich in der Praxis wegen der begrenzten Kapazität der Schüttelapparate und des Zeitaufwandes Durchführungsschwierigkeiten ergeben. HORTER und KLEIN 1969 machen daher den oben erläuterten Vorschlag, die Schüttelzeit durch einfaches stehenlassen (Stehzeit) der Futterproben

im Sinne eines "Einweichens" vor dem Schütteln zu verkürzen.

Wegen der praktischen Bedeutung der Frage der Verkürzung der Schütteldauer durch eine vorausgehende Stehzeit wurde die experimentelle Prüfung dieser Frage in der vorgelegten Arbeit vor anderen noch offenen Fragen zum Thema Methodik der bakteriologischen Futtermitteluntersuchung aufgenommen.

C. Die Reproduzierbarkeit der Befunde

In der Literatur fand ich nur zwei Angaben, die sich bei Mehrfachuntersuchungen mit der Frage der Reproduzierbarkeit der mikrobiologischen Befunde bei mehlartigen Mischfuttermitteln befassen. WERNERY 1971 stellt fest, daß die pro Gramm Futter nachgewiesenen Keimzahlen bei vergleichbaren Versuchsansätzen relativ stark variieren. Bei rechnerischer Auswertung von 28 Versuchsansätzen aus einem 50 kg Sack betrug die höchste nachgewiesene Keimzahl das 4,03 fache der kleinsten Keimzahl. Auf das durchschnittliche Ergebnis bezogen, ließ sich als Variationskoeffizient $v = \pm 29,3 \%$ ermitteln.

WERNERY und HILLIGER 1973 konnten bei der Untersuchung von Schweinefutter die am Kükenmehl erhobenen Befunde WERNERYs 1971 bestätigen. Sie gelangen ebenfalls zu dem Schluß, daß auch bei sorgfältiger Beachtung der Einheitlichkeit der Untersuchungstechnik mit erheblichen Ergebnisunterschieden zu rechnen ist. Bei einer Untersuchung von 10 Ansätzen aus einem 50 kg Sack verhielt sich der kleinste und größte Wert wie 1 : 2,5. Die relative Streuung in Form des Variationskoeffizienten ergab sich mit $v = \pm 29,1 \%$.

Offensichtlich muß man in Anlehnung an die Ergebnisse der beiden genannten Autoren bei mehlartigen Futtermitt-

teln bei Mehrfachuntersuchungen mit einer erheblichen Streuung der Befunde rechnen. Es ist zu vermuten, daß die Ungleichmäßigkeit des Feingehaltes des Ausgangsmaterials die primäre Ursache dafür ist, wobei außerdem noch methodische Faktoren berücksichtigt werden müssen.

Die Kenntnisse über die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von Vielfachuntersuchungen bei der mikrobiologischen Futtermitteluntersuchung sind z.Zt. noch außerordentlich gering. Die bisherigen Angaben lassen es ratsam erscheinen, diesem Fragenkreis künftig mehr Beachtung zu schenken und zwischenzeitlich bei der Beurteilung von Ergebnissen Festlegungen über Grenzwerte nicht als starre Grenzen, sondern in erster Linie als Beurteilungshilfen aufzufassen.

II. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

In der Literaturübersicht kommt das Anliegen mehrerer Autoren zum Ausdruck, die mikrobiologische Prüfung so zu gestalten, daß unter Anwendung einheitlicher Prüfungsverfahren optimale Untersuchungsergebnisse erzielt werden. Von der Notwendigkeit der Verbesserung und Vereinheitlichung der Methodik der mikrobiologischen Futtermitteluntersuchung ausgehend, wurde mir die Aufgabe gestellt, am Modell eines handelsüblichen Mischfutters zu prüfen, inwieweit es möglich ist, die 1 bis 2 stündige Schüttelzeit, die bei der mikrobiologischen Futtermitteluntersuchung zur Erzielung eines optimalen Keimnachweises erforderlich ist, dadurch zu verkürzen, daß man die Futterprobe vor dem Schütteln in der Suspensionsflüssigkeit stehen läßt. Dabei wird ein Einweich-effekt in dem Sinne erwartet, daß sich die Mikroorganismen bei der abschließenden Schüttelung leichter und damit schneller von den Futterpartikeln lösen. Für die Dauer des Stehens der Futterprobe in der Suspensionsflüssigkeit wird der Ausdruck "Stehzeit" benutzt. Es sollte eine Stehzeit von 1 Stunde, 2 Stunden, 4 Stunden und 6 Stunden geprüft werden. Zu dieser Prüfung war es zunächst notwendig festzustellen, nach welcher Schüttelzeit bei dem benutzten Futter ein optimaler Keimnachweis sichergestellt wird. Auch schien es zweckmäßig, die bisher noch nicht bestätigten Angaben von WERNERY 1971 über den Einfluß der Absetzzeit auf den Keimnachweis zu überprüfen. Schließlich sollten bei den Untersuchungen Informationen gesammelt werden, die es erlauben, die Reproduzierbarkeit der Befunde bei Mehrfachuntersuchungen an einer Futtermittelcharge zu bewerten. Für diese Aufgaben wurden 7 Versuchsreihen mit insgesamt 50 Versuchsansätzen vorgesehen. In der Tabelle 1 sind diese 7 Versuchsreihen in Form einer Übersicht inhaltlich und methodisch erläutert.

Nr. der Versuchsreihe	Untersuchungsziel	Zahl der Versuchsansätze	Stehzeit vor Schüttelung (Std.)	a) max. Schütteldauer (min) b) Häufigkeit der Entnahme von Proben	Absetzen in Schüttelflasche	Reagenzglas
1	Ermitteln d. Keimnachweisplateaus	5	0	a) 270 b) 12	+	-
2	Ermittlung d. optimalen Absetzzeit	5	0	a) 180 b) 4	-	+
3	Ermittlung d. Einflusses einer 1stdg. Stehzeit	5	1	a) 150 b) 5	-	+
4	Ermittlung d. Einflusses einer 2stdg. Stehzeit	5	2	a) 150 b) 5	-	+
5	Ermittlung d. Einflusses einer 4stdg. Stehzeit	5	4	a) 150 b) 5	-	+
6	Ermittlung d. Einflusses einer 6stdg. Stehzeit	5	6	a) 150 b) 5	-	+
7	Reproduzierbarkeit d. Keimnachweis.					
	a. mit eigener Probenahme	5	0	a) 150 b) 2	-	+
	b. identisch mit Nr. 4	5	0	a) 150 b) 2	-	+
	c. identisch mit Nr. 5	5	0	a) 150 b) 2	-	+
	d. identisch mit Nr. 6	5	0	a) 150 b) 2	-	+

Tab. 1: Zusammenstellung der in der vorgelegten Arbeit durchgeführten 7 Versuchsreihen in Form einer inhaltlichen und methodischen Übersicht

A. Material und Methoden

1. Das untersuchte Futter

Die vorgelegten Untersuchungen wurden mit einem mehlartigen Mischfutter für die Schweinemast durchgeführt. Es handelt sich dabei um das Schweinemast-Alleinfutter I nach DLG-Standard, TYPE "S" eines Berliner Kraftfutterwerkes. Für die eigenen Untersuchungen wurde der Inhalt nur eines 50-kg Sackes benutzt. Als Sackprägungsdatum ist der 15.1.1973 angegeben. Das Schweinemastfutter hat laut Deklaration folgende Zusammensetzung:

28	% Weizen, geschr.
20	% Gerste, geschr.
14	% Malzkeime, getr., zerkl.
5	% Hafer, geschr.
5	% Mais, geschr.
5	% Weizenkleie
5	% Sojaschrot, extr.
5	% Reisfuttermehl, gelb
4	% Tapioka-Melasse 70 : 30
3	% Tierkörpermehl
2,4	% Mineralstoffmischung für Schweine IIa-18
2	% Fischmehl
1	% Vitamin-Vormischung für Schweine
0,6	% antibiot. Futterzusatzmischung (Chlortetracyclin, geb. an extr. Sojaschrot) "Aureomycin 4000" Reg.-Nr. 3301/68

100,0 %

=====

Von der Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalt Kiel wurde das Futter mit folgendem Ergebnis untersucht:

Gesamt-Analyse:

Wasser	Rohasche (Mineral- stoffe)	Roh- eiweiß (Nx6,25)	Rohfett (Äther- extrakt)	Roh- faser	N-freie Extrakt- stoffe
%	%	%	%	%	%
10,3	8,2	18,3	3,7	5,6	53,9

Siebung: Der prozentuale Anteil der Korngrößenfraktion von über 1,5 mm beträgt 1% bei 100 g Futteransatz.

Reinheit: Abgesehen vom Tapiokamehl, das nicht ermittelt werden konnte, stimmt die Zusammensetzung mit der Deklaration überein.

2. Die Versuchstechnik

Die benutzte Versuchstechnik entsprach im wesentlichen der bei WERNERY 1971 angegebenen Methode. Bei Abweichungen wird an gegebener Stelle besonders darauf hingewiesen.

a. Entnahme

Aus dem Futtersack wurden für jeden Versuch ca. 500 g Mischfuttermittel mit einer sterilen Deckelglasschale entnommen. Diese größere Entnahmemenge wurde gewählt, um im Laufe der Versuchszeit möglichst den gesamten Inhalt des Futtersackes den Untersuchungen zuzuführen.

b. Ansatz

Für jeden Versuchsansatz wurden 10 g des Futtermittels eingewogen und in einer sterilen Steilbrustflasche (250 ml) mit Glasstopfen mit 200 ml Pepton-NaCl-Lösung (0,1% Pepton und 0,85% NaCl) suspendiert. Der pH-Wert der Lösung betrug 7,0 - 7,4.

c. Stehzeit

Zu den Versuchen, bei denen der Einfluß der Stehzeit auf die Gesamtkeimzahl untersucht werden sollte, blieb der Ansatz in den Steilbrustflaschen bei Zimmertemperatur stehen, um anschließend geschüttelt zu werden. Die verschiedenen Stehzeiten betrugen 1 - 6 Stunden.

d. Schüttelvorgang und Reibungsmittel

Geschüttelt wurde mit Magnetrührern der Firma Janke & Kun-
kel KG, Staufen i. Breisgau, Typ IKA-COMBIMAG-RCO mit der maximalen Umdrehungsgeschwindigkeit von 1000 U/min.

Als Rührer dienten sterile, 5 cm lange Eisenstäbe mit Plastiküberzug, die jeweils ein Gewicht von 8,8 g besaßen. Die Schüttelzeiten lagen zwischen 5 min und 270 min. Als Reibungsmittel wurden sterile Glasperlen in einer Menge von 15 g bei einem Perlendurchmesser von 3 mm verwendet. Die durch das Rühren verursachte Wärmebildung durch den Motor, gemessen an der Temperaturzunahme des Wasserbades, in das die Schüttelflaschen eingestellt waren, betrug bei einer Schüttelzeit von 300 min durchschnittlich +3,1 grad C.

e. Absetzen der Futterbestandteile

Zur Entnahme der keimhaltigen Suspensionsflüssigkeit wurde die Schüttelung unterbrochen, so daß die größeren Futterbestandteile zu Boden sinken konnten. Das Absetzen erfolgte entweder in der Steilbrustflasche selbst oder im Reagenzglas. Zum Absetzen im Reagenzglas wurden mit einer 10 ml-Pipette jeweils 10 ml aus der Schüttelflasche entnommen, nachdem sich die groben Futterbestandteile etwa in 1 min abgesetzt hatten. Nach dem Absetzen in der Schüttelflasche wurde jeweils mit der Pipette 1 ml zur direkten Anlage einer Verdünnungsreihe entnommen.

Das Absetzen direkt in der Steilbrustflasche wurde bevorzugt, wenn mehr als 5 Proben entnommen wurden. Dadurch sollte vermieden werden, daß das Verhältnis zwischen Futter- und Flüssigkeitsmenge sich zu stark gegenüber dem Ansatz verschiebt. Das Verlegen des Absetzens in das Reagenzglas wurde bei einer Entnahme bis zu 5 Proben bevorzugt, um die Schüttelzeit nicht durch längere Schüttelpausen unterbrechen zu müssen. Bei der Prüfung der Frage des Einflusses der Absetzzeit auf das Ergebnis der Gesamtkeimzahlbestimmung wurden Absetzzeiten zwischen 2 und 20 min, bei den Versuchsreihen über den Einfluß der Stehzeit ausschließlich 10 min benutzt.

f. Pipettier- und Verdünnungstechnik

Im "Röhrchenverfahren" (SINELL u. Mitarb. 1966 und UNTERMANN 1967) wurden Verdünnungsstufen angelegt, die von unverdünnt über 1:10, 1:100 bis 1:1000 gingen. Der Ansatz betrug einheitlich 1 ml Keimsuspension auf 9 ml sterile Pepton-NaCl-Lösung, was einer Verdünnung um eine Zehnerpotenz entspricht. Zur Verwendung kamen dabei übliche Reagenzgläser mit Sterilstopfen (Zellstoff). Auf Glasperlen im Reagenzglas wurde verzichtet, da die Keimsuspension im Reagenzglas nicht mit der Hand (WERNERY 1971) geschüttelt wurde, sondern mit einem Vibrator der Firma Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz, der Type VORTEX-GENIE. Nach dem jeweiligen Schütteln bzw. Absetzen wurden 1 ml oder 10 ml der Suspensionsflüssigkeit in ein steriles Reagenzglas überpipettiert. Die Entnahme erfolgte ca. 1 cm unterhalb des Flüssigkeitsspiegels der Suspension. Das Überpipettieren zur Herstellung der Verdünnungsreihen erfolgte mit 1 ml Pipetten. Sie wurden durch Anlegen an die Reagenzglaswand entleert, ohne daß sie in die Verdünnungsflüssigkeit getaucht oder ausgeblasen wurden (UNTERMANN 1967). Für jede Verdünnungsstufe wurde eine sterile Pipette verwendet. Pipettenspitze und Reagenzglasöffnung wurden regelmässig abgeflammt.

g. Nährmedium

Als Nährmedium diente Standard-II-Nähragar der Firma Merck, Darmstadt, bestehend aus Spezialpepton, Natriumchlorid und Agar Agar. Zur Bereitung des Nähragars wurden 25 g des pulverförmigen Fertignährbodens einem Liter frisch destilliertem Wasser zugesetzt, durch ausgiebiges Umschütteln gleichmäßig verteilt und bis zur völligen Lösung im Dampftopf gekocht. Die Sterilisation erfolgte 15 min lang im Autoklaven bei einer Temperatur von $+121^{\circ}\text{C}$. Der pH des gebrauchsfertigen Nährbodens liegt bei 7,4 - 7,6.

h. Beimpfen der Nähragarplatten

Für alle Untersuchungen wurden für jede Verdünnungsstufe drei Nähragarplatten als Oberflächenkultur parallel angelegt, wobei jede Platte mit 0,1 ml Keimsuspension aus einer 0,1 ml-"Silberbrand"-Pipette beimpft wurde. Mit einem sterilen Drigalski-Spatel erfolgte das Ausspateln der Keimsuspension auf der ganzen Agaroberfläche.

i. Bebrüten der Nähragarplatten

Die Bebrütung aller Nähragarplatten erfolgte einheitlich 96 Stunden bei Zimmertemperatur. Die durchschnittliche Bebrütungstemperatur wurde durch Schreibstreifen von Thermohygrographen ermittelt und betrug $+19,3^{\circ}\text{C}$.

3. Zählung und Bewertung

a. Auszählen der Nähragarplatten

Die Bakterienkolonien wurden mit einem Zählgerät Typ PLACONT der Firma Boskamp, Gerätebau KG, Kreis Bonn, ausgezählt. Das Zählen erfolgte ohne Lupe nach 48, 72 und 96 Stunden, wobei zur Auswertung grundsätzlich das Zählergebnis nach einer 96-stündigen Bebrütung benutzt wurde. Als Auswertbereich wählte ich in Anlehnung an UNZERMANN 1967 30 - 300 Kolonien pro Nähragarplatte. Dieser Bereich lag bei den Versuchen in der Regel bei einer Verdünnung von 1:100 vor. Bei der Darstellung der Befunde im Abschnitt "B. Ergebnisse" wird bevorzugt die **Z a h l d e r K o l o n i e n** im Mittel aus je 3 parallel angelegten Nähragarplatten in der Verdünnungsstufe 1:100 angegeben. Die Gesamtkeimzahl je 1 g Futter ergibt sich daraus rechnerisch durch Multiplikation mit dem Faktor 20 000.

b. Bakteriologische Sterilitätskontrollen

Um die Sterilität der verwendeten Nähragarplatten, der

Suspensionsflüssigkeit, der Spatel, der Pipetten und der Reagenzgläser zu prüfen, wurden zu jedem Versuch Kontrollplatten angelegt, um eine Aussage über Sterilisationsmängel bzw. über den Grad der Sekundärinfektion der angelegten Kulturen durch Luftkeime u.ä. zu gewinnen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

KONTROLLEN:	Zahl der angelegten Kontrollen	Zahl der sekundärinfizierten Platten nach Koloniedichte unterteilt			
		steril	1 - 4 Kol./Pl.	5 - 10 Kol./Pl.	über 10 Kol./Pl.
Pept.-NaCl-Lösung v.d. Versuch	30	26	4	0	0
Pept.-NaCl-Lösung n.d. Versuch	30	24	5	1	0
Nähragarplatten	30	21	7	1	1
Spatel	30	22	6	1	1
Reagenzgläser	30	21	7	1	1
Pipetten	30	22	8	0	0

Tab. 2: Ergebnisse der bakteriologischen Sterilitätskontrollen

B. Ergebnisse

1. Ermittlung des Plateaus des Keimnachweises

Es wurden in der Versuchsreihe Nr. 1 in 5 Versuchsansätzen jeweils 10 g Schweinemast-Alleinfutter I mit 200 ml Pepton-NaCl-Lösung in einer Steilbrustflasche suspendiert und

mit einem Magnetrührer geschüttelt. Ich wählte die Schüttelzeiten von 5, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 und 270 min, die vor jeder Entnahme in Anlehnung an VERNERY 1971 für eine Absetzzeit von 10 min unterbrochen wurde. Somit verlängerte sich die Verweilzeit des Futters in der Flüssigkeit vor der Probeentnahme um jeweils 10 min, insgesamt also um 120 min. Die letzte Probeentnahme erfolgte mithin 390 min nach dem Ansatz der Probe.

In der Abbildung 2 sind die Ergebnisse der Versuchsreihe Nr. 1 als Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 5 Versuchsansätzen dargestellt. Es zeigt sich, daß die Koloniezahl pro Nähragarplatte bis zu 90 min Schüttelzeit ansteigt, anschließend einen relativ gleichbleibenden Wert erreicht, um ab 180 min wieder anzusteigen. Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse bis zum Erreichen des Nachweisplateaus in relativer Darstellung, wobei die nachgewiesene Koloniezahl nach einer Schüttelzeit von 150 min gleich 100 % gesetzt ist. Die Nachweisleistung verbessert sich demnach erheblich mit der Verlängerung der Schüttelzeit und erreicht etwa nach 90 min ein Maximum, das für die Dauer von mindestens 2 Stunden erhalten bleibt.

Die erhobenen Befunde bestätigen damit die Aussagen von VERNERY 1971 und VERNERY und HILLIGER 1973 hinsichtlich der Anstiegstendenz und der Ausbildung eines Plateaus beim Keimnachweis.

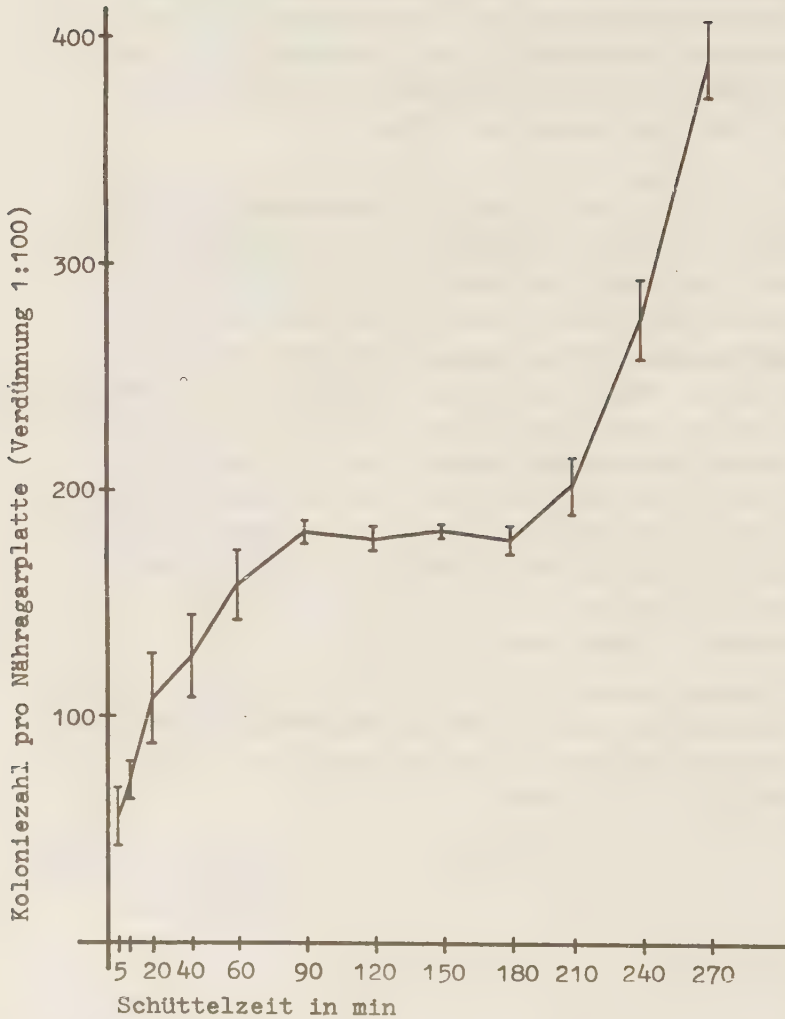


Abb. 2: Einfluß der Schütteldauer auf die nachweisbare Koloniezahl. Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 5 Versuchsansätzen der Versuchsreihe Nr. 1

Schütteldauer in min	Verweilzeit in d. Suspensionsflüs- sigkeit in min	Keimnachweis in % 100 % = Keimzahl nach 150 min Schüt- teln
5 min	15	30,4 %
10 min	30	39,7 %
20 min	50	60,7 %
40 min	80	70,1 %
60 min	110	87,4 %
90 min	150	100,1 %
120 min	190	98,9 %
150 min	230	100,0 %
180 min	270	103,9 %
210 min	310	112,6 %
240 min	350	152,7 %
270 min	390	217,3 %

Tab. 3: Nachweisbare Koloniezahlen in relativer
Darstellung zum Ergebnis nach 150 min
Schütteldauer. Mittelwerte aus 5 Versuchs-
ansätzen der Versuchsreihe Nr. 1

Die Befunde lassen sich zusammenfassend dahingehend in-
terpretieren, daß während einer Schüttelzeit von 90 min
die vermehrungsfähigen Keime von den Futterpartikeln
abgelöst werden und sich in der Suspensionsflüssigkeit
verteilen. Daraus ergibt sich bei weiterer Schüttelver-
längerung bis zu 180 min ein etwa gleichbleibender
Keimnachweis. Bei dieser Aussage bleibt die Tatsache
unberücksichtigt, daß das Schütteln vor jeder Entnahme
je 10 min unterbrochen wurde. Um den Einfluß dieser
Stehzeiten beurteilen zu können, wurde daher in der
Versuchsreihe 2 die Zahl der Entnahmen reduziert, die
erste Probe erst nach einer Schütteldauer von 90 min
entnommen und das Absetzen in ein Reagenzglas verlegt.

2. Einfluß verschiedener Absetzzeiten auf die nachweisbare Gesamtkeimzahl

In der Versuchsreihe Nr. 2 soll der Einfluß verschiedener Absetzzeiten nach einer Schütteldauer zwischen 90 und 180 min geprüft werden. In diesen Zeitabschnitt fällt, wie die Befunde der ersten Versuchsreihe zeigen, das Plateau des Keimnachweises, welches dort nach einer fünfmaligen Schüttelunterbrechung und einer anschließenden Absetzzeit von jeweils 10 min in der Steilbrustflasche erreicht wurde. Im folgenden Versuch soll gleichzeitig mit der Frage der optimalen Absetzzeit im ermittelten Keimnachweis-Plateau nochmals die Lage des Plateaus im Bereich der Schütteldauer von 90 bis 180 min überprüft werden.

Zum Ansatz kamen wieder 5 Proben von je 10 g Futter mit 200 ml Pepton-NaCl-Lösung. Die Proben wurden bis 180 min mit je einer Unterbrechung von einer Minute nach 90, 120 und 150 min geschüttelt. Das Absetzen erfolgte bei dieser Versuchsreihe im Reagenzglas, um die Schüttelzeit nicht durch längere Pausen unterbrechen zu müssen. Dabei wurden nach 1 min Schüttelpause 10 ml der Keimsuspension aus der Steilbrustflasche in ein Reagenzglas überpipetiert. Nach Absetzzeiten von jeweils 2, 5, 10, 15 und 20 min erfolgte die Anlage einer Verdünnungsreihe mit je 1 ml. Von dieser wurden dann je 0,1 ml Keimsuspension aus den verschiedenen Verdünnungsstufen auf den Nährboden verimpft. Die in der Verdünnungsstufe 1 : 100 ermittelten Keimzahlen sind als Mittelwerte aus den 5 Ansätzen mit Standardabweichungen in Abbildung 3 dargestellt.

Aus der Abbildung 3 ist ersichtlich, daß die Kolonienzahlen am tiefsten liegen, wenn 2 min nach dem Schütteln die Suspensionsflüssigkeit aus dem Reagenzglas entnommen wurde. Mit Verlängerung der Absetzzeit steigt die nachweisbare Keimzahl an und verändert sich nach einer

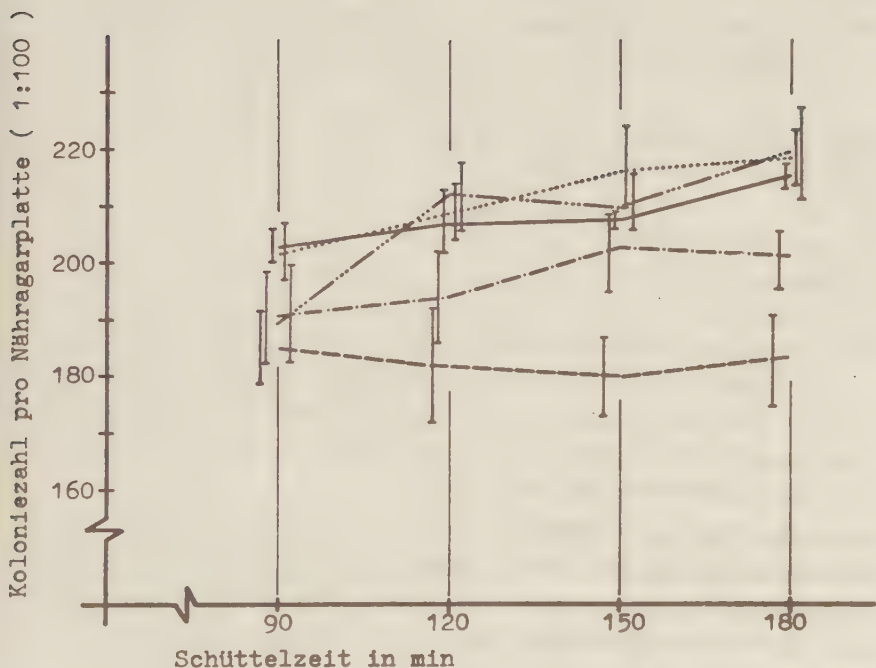


Abb. 3: Einfluß verschiedener Absetzzeiten auf die nachweisbare Koloniezahl nach einer Schüttelzeit zwischen 90 und 100min

- nach 2min Absetzzeit im Reagenzglas
- nach 5min Absetzzeit im Reagenzglas
- nach 10min Absetzzeit im Reagenzglas
- nach 15min Absetzzeit im Reagenzglas
- nach 20min Absetzzeit im Reagenzglas

Mittelwerte mit Standardabweichungen aus je 5 Versuchsansätzen der Versuchsreihe Nr. 2

Absetzzeit von 10 min nur noch unwesentlich. Setzt man das Ergebnis nach einer Absetzzeit von 10 min gleich 100 %, so lassen sich im Mittel die in Tabelle 4 zusammengestellten Werte errechnen. Die dort genannten Befunde stehen in Übereinstimmung mit den Angaben von WERNERY 1971. Er fand, daß nach Erreichen des Keimnachweisplateaus mit Verlängerung der Absetzzeit bis zu 10 min eine optimale Keimausbeute zu erzielen ist.

Nach 2 min Absetzzeit 87,7 % des Kolonienachweises					
"	5	"	"	94,7 %	"
"	10	"	"	100,0 %	"
"	15	"	"	101,8 %	"
"	20	"	"	99,6 %	"

Tab. 4: Keimnachweisleistung nach verschiedenen Absetzzeiten, wobei die nachgewiesene Koloniezahl nach der Absetzzeit von 10 min gleich 100 % gesetzt ist. Mittelwerte aus je 5 Versuchen der Versuchsreihe Nr. 2

Hinsichtlich der Plateaubildung zeigt sich bei dieser Versuchsreihe im Mittel aus allen Absetzzeiten, daß mit 90 min Schütteldauer das Plateau noch nicht ganz erreicht ist. Die Nachweisleistung in dieser Versuchsreihe Nr. 2 ist parallel zu Tabelle 3 relativ zum Ergebnis nach 150 min Schütteln als Tabelle 5 dargestellt.

Schütteldauer in min	Verweilzeit in d. Suspensionsflü- ssigkeit in min	Keimnachweis in % (150 min Schütteln = 100 %)
90	101	95,1 %
120	132	98,7 %
150	163	100,0 %
180	194	101,3 %

Tab. 5: Nachweisbare Koloniezahlen in relativer Darstellung zum Ergebnis nach 150 min Schütteldauer. Mittelwerte aus je 4 Kulturanlagen der 5 Versuchsansätze aus Versuchsreihe Nr. 2

Dieser Befund wird nicht als ein Gegensatz zu den Ergebnissen der Versuchsreihe Nr. 1 aufgefaßt. Die Verlängerung der Schütteldauer bis zum Erreichen des Plateaus von 90 auf 120 min ist damit begründbar, daß bei der ersten Versuchsreihe bis zu einer Entnahme nach 90 min Schütteln die Proben zusätzlich 50 min im Sinne einer Stehzeit standen, was den Ablösungsvorgang der Mikroorganismen von den Futterpartikeln sicher eher begünstigte als beungünstigte. Bei dieser Sachlage erscheint es mir daher vertretbar, bei den weiteren Versuchen davon auszugehen, daß bei dem benutzten Futter die Plateaubildung nach einer ununterbrochenen Schütteldauer von 120 min erreicht wird.

Aus diesem Grunde ist es sinnvoll, die Auswertung bezüglich der Absetzzeiten noch einmal unter Auslassung der 90 min-Werte zu wiederholen, um sicher zu sein, daß die Bewertung innerhalb des Nachweisplateaus erfolgt. In Tabelle 6 ist diese Auswertung der in Tabelle 4 dargestellten Auswertung gegenüber gestellt. Die gefundenen Unterschiede können als unerheblich bezeichnet werden. Aus diesem Grunde entschied ich mich in Anlehnung an WERNERY 1971 bei der Durchführung der folgenden Versuche für eine Absetzzeit von 10 min. Auf eine statistische Prüfung meiner Befunde auf Signifikanz wurde in Anbetracht der kleinen Versuchsanzahl verzichtet.

Absetzzeit	Relative Keimzahl gemittelt aus d. Ergebnissen nach Schüttel- lung von	
	90, 120, 150 u. 180 min	120, 150 u. 180 min
2 min	87,7 %	85,2 %
5 min	94,7 %	94,6 %
10 min	100,0 %	100,0 %
15 min	101,8 %	102,8 %
20 min	99,6 %	101,4 %

Tab. 6: Bewertung verschiedener Absetzzeiten als Gegenüberstellung der Schüttelzeitbereiche 90 bis 180 min bzw. 120 bis 180 min. Mittelwerte von jeweils 5 Versuchsansätzen der Versuchsreihe Nr. 2, wobei 10 min Absetzzeit gleich 100 % gesetzt ist

3. Einfluß verschiedener Stehzeiten (Einweichzeiten) auf die nachweisbare Gesamtkeimzahl

Die vier Versuchsreihen Nr. 3, 4, 5 und 6 sollen klären, in welchem Umfang sich bei der Aufbereitung von Mischfutter für die bakteriologische Gesamtkeimzahlbestimmung ein Schütteln durch einfaches Aufschwemmen und Stehenlassen ersetzen läßt.

Für den Futteransatz wurden 10 g Schweinemast-Alleinfutter I ausgewogen und in eine 250 ml Steilbrustflasche verbracht. Die eingewogene Futtermenge wurde anschließend mit 200 ml Pepton-NaCl-Lösung übergossen und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Als Stehzeiten wurden 1, 2, 4 und 6 Stunden gewählt. Eine Verlängerung über 6 Stunden hinaus erschien mir nicht ratsam, da einerseits eine solche Verlängerung aus arbeitstechnischen und praktischen Gründen wenig sinnvoll ist und andererseits zu erwarten ist, daß man sich bei noch längeren Zeiten dem Beginn der Keimvermehrung nähert.

Für die 4 verschiedenen Stehzeiten wurde je eine Versuchsreihe mit jeweils 5 Versuchsansätzen durchgeführt, insgesamt also 20 Versuchsansätze. Nach dem Ablauf der Stehzeit kam die Keimsuspension zur Schüttelung auf den Magnetrührer. Bei 10, 30, 60, 120 und 150 min wurde das Schütteln für je 1 min unterbrochen und anschließend 10 ml der Suspension in ein Reagenzglas überpipettiert. Nach einer Absetzzeit von jeweils 10 min erfolgte das Anlegen der Verdunnungsreihe, von der die Verimpfung auf den Nährboden erfolgte.

Mit Ausnahme der Versuchsreihe Nr. 3 mit der Stehzeit von 1 Stunde wurde bei den weiteren Versuchsreihen Nr. 4 bis 6 gleichzeitig ein Parallelansatz aus der gleichen Probeentnahme vorgenommen, der ohne Stehzeit sofort nach Suspensidierung mittels Magnetrührer bis zu 120 und 150 min durchgeschüttelt wurde (Versuchsreihe Nr. 7). Auch hier erfolgte für das Absetzen von

10 min ein oberpinettieren von 10 ml Keimsuspension in ein Reagenzglas. Zur Versuchsreihe Nr. 3 wurden diese Parallelansätze mit 5 gesonderten Probeentnahmen nachgeholt, so daß in der Versuchsreihe Nr. 7 insgesamt 20 Versuchsansätze angelegt wurden und zur Auswertung kamen.

Die Ergebnisse der Versuchsreihen Nr. 3 bis 6 zeigen die Abbildungen 4 bis 7. Sie geben die Mittelwerte von je 5 Versuchen mit Standardabweichungen wieder. In den Abbildungen 5 bis 7 sind die Ergebnisse der Parallelansätze mit eingetragen, die ebenfalls die Mittelwerte aus 5 Versuchen mit Standardabweichungen darstellen. Die Befunde dieser Versuchsreihen sind in der Abbildung 8 im Abschnitt Diskussion auf einer Darstellung zusammengefaßt wiedergegeben. Die zahlenmäßigen Ergebnisse in Kolonien pro Gramm Futter mit Variationskoeffizient nach einer Schütteldauer von 120 und 150 min sind in Tabelle 7 dargestellt.

Stehzeit	Durchschnittl. Koloniezahl pro Gramm Futter nach einer Schütteldauer von			
	120 min		150 min	
	Stehzeit- versuchs- reihen	Parallel- versuchs- reihe Nr.7	Stehzeit- versuchs- reihen	Parallel- versuchs- reihe Nr.7
1 Stunde (Vers.-R.Nr.3)	3.708.000 ± 11,9%	1) 2.537.200	3.684.000	1) 2.532.000
2 Stunden (Vers.-R.Nr.4)	2.848.000 ± 11,6%	2.402.400	2.790.000	2.454.400
4 Stunden (Vers.-R.Nr.5)	2.770.000 ± 4,23%	2.582.800	2.766.000	2.517.600
6 Stunden (Vers.-R.Nr.6)	2.260.000 ± 12,9%	2.453.200	2.796.000	2.492.000
Mittelwert	2.896.500 ± 19,6%	2.502.900 ± 8,1%	3.009.000 ± 14,7%	2.499.100 ± 7,8%

1) keine zeitparallele Probenentnahme zu Vers.-Reihe Nr. 3

Tab. 7: Nach 120 und 150 min Schütteldauer pro Gramm Futter nachgewiesene Koloniezahlen in den Versuchsreihen

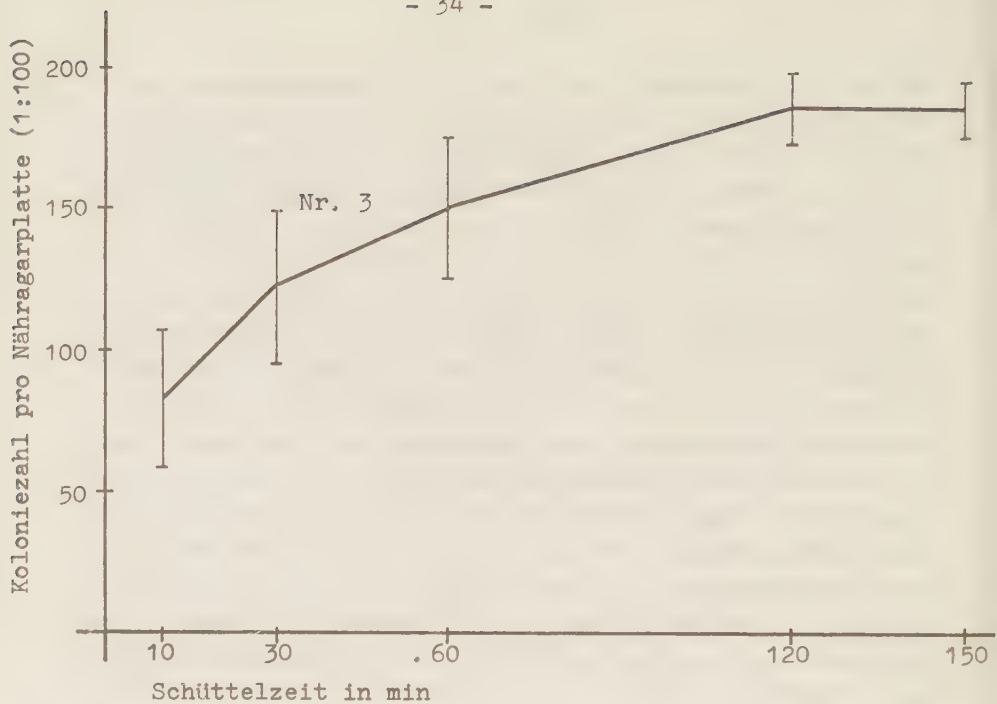


Abb. 4: Koloniezahl nach einer Stehzeit von 1 Stunde ohne Vergleichsansatz (Versuchsreihe Nr. 3)

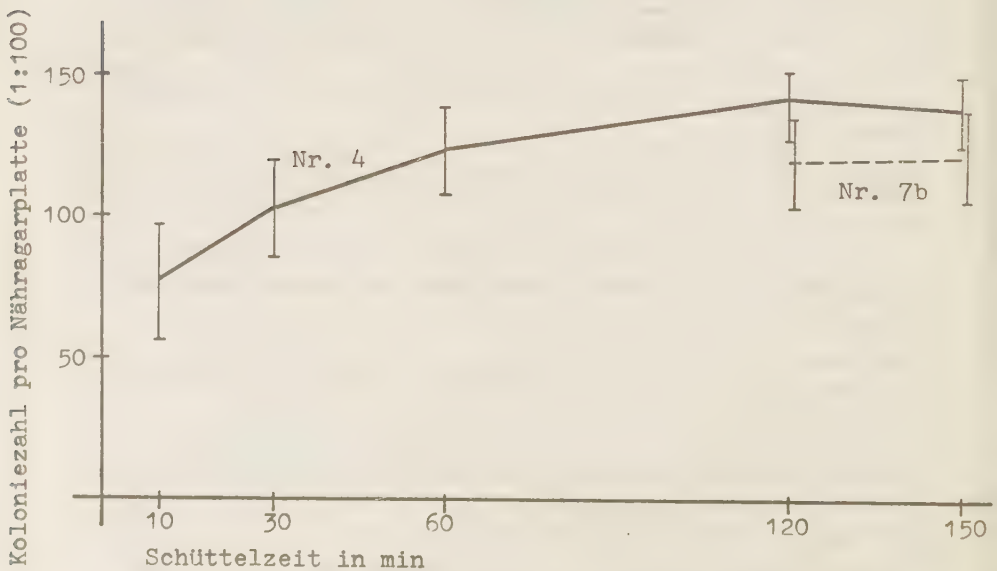
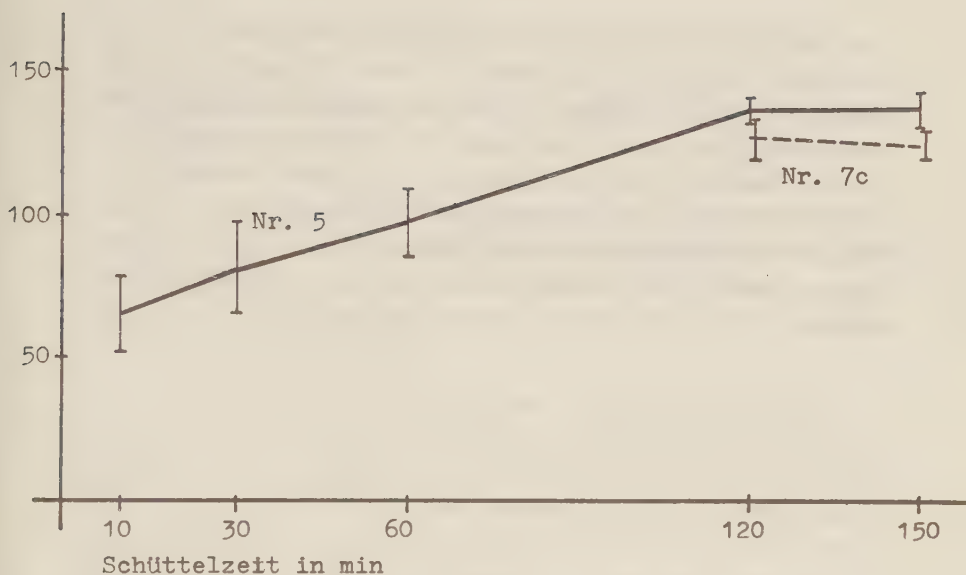
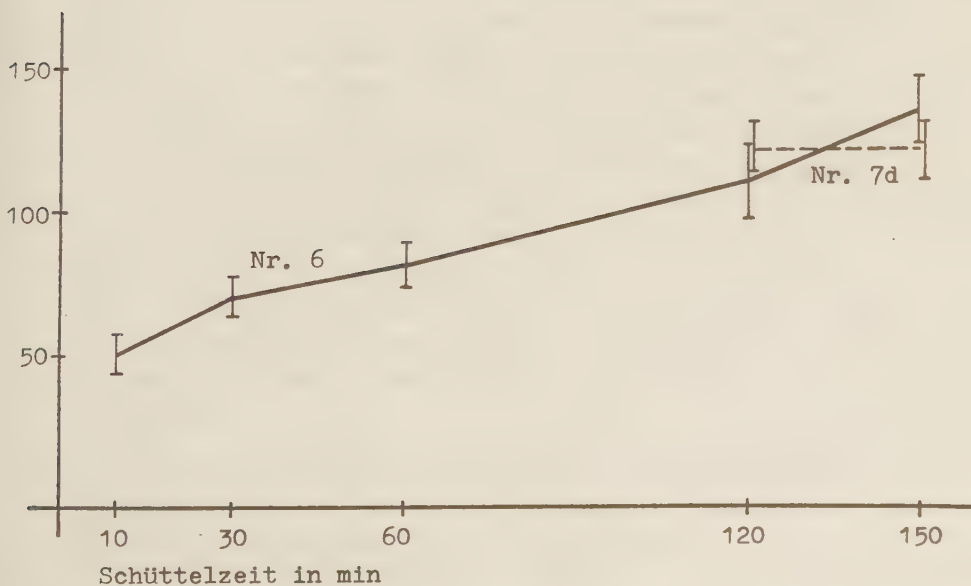


Abb. 5: Koloniezahl nach einer Stehzeit von 2 Stunden mit Vergleichs-



bb. 6: Koloniezahl nach einer Stehzeit von 4 Stunden mit Vergleichs-
ansatz (Versuchsreihen Nr. 5 und 7c)



bb. 7: Koloniezahl nach einer Stehzeit von 6 Stunden mit Vergleichs-
ansatz (Versuchsreihen Nr. 6 und 7d)

Aus den Abbildungen ist ersichtlich, daß sich bei den Versuchsreihen mit 1, 2 und 4 Stunden Stehzeit mit der Länge der Schütteldauer die nachweisbare Gesamtkeimzahl vergrößert und sich erst nach 120 min Schüttelzeit ein Keimnachweisplateau abzeichnet. Bei einer Stehzeit von 6 Stunden konnte bei keinem der 5 Versuchsansätze ein Plateau nachgewiesen werden. Die Keimzahl vergrößerte sich hierbei kontinuierlich mit der Länge der Schütteldauer.

III. D I S K U S S I O N

A. Die Reproduzierbarkeit der Befunde bei Mehrfachuntersuchungen

Für die Interpretation der erhobenen Befunde über den Einfluß der Stehzeit auf die notwendige Schüttelzeit ist es zweckmäßig, zunächst die eigenen Feststellungen zur Frage der Reproduzierbarkeit des Nachweises der Koloniezahlen zu diskutieren.

Die eigenen Beobachtungen wurden ausschließlich bei Mehrfachuntersuchungen aus einem 50 kg Sack erhoben. Für eine Aussage über die Frage der Reproduzierbarkeit sind von meinen Versuchen optimal die 20 Versuchsansätze der Versuchsreihe Nr. 7 geeignet, da sie methodisch einheitlich durchgeführt und die Schüttelzeit vor dem Erreichen des Nachweisplateaus nicht unterbrochen wurde. Der kulturelle Ansatz beschränkte sich auf eine Schüttelzeit nach 120 min und nach 150 min.

In der Tabelle 8 wurden die pro Gramm Futter nachgewiesenen Keimzahlen nach beiden Schüttelzeiten gegenübergestellt. Als Standardabweichung ließen sich für das Schweinemast-Alleinfutter I $2.502.900 \pm 202.426$ Kolonien/g Futter bzw. $2.499.100 \pm 194.273$ Kolonien/g Futter errechnen. Die relative Streuung in Form des Variationskoeffizienten ergibt sich dabei mit $v = \pm 8,1 \%$ bzw. $v = \pm 7,8 \%$. Die Übereinstimmung der Keimzahlen, die nach 120 und nach 150 min Schüttelzeit ermittelt wurden, wird als Nachweis dafür angesehen, daß das Keimnachweisplateau nach einer Schütteldauer von 120 min sicher erreicht ist.

Für die gleichen Schüttelzeiten wurden aus den jeweils 5 Versuchsansätzen der Versuchsreihen Nr. 1 und Nr. 2 folgende Variationskoeffizienten errechnet:

Nach einer Schüttelzeit von	120 min	150 min
Versuchs-Nr. 1	$v = \pm 4,9 \%$	$v = \pm 3,5 \%$
Versuchs-Nr. 2	$v = \pm 5,6 \%$	$v = \pm 2,6 \%$

Kolonien pro Gramm Futter nach einer Schüttelzeit von	
120 min	150 min
2.466.000	2.500.000
2.480.000	2.520.000
2.566.000	2.540.000
2.674.000	2.620.000
2.500.000	2.480.000
2.326.000	2.186.000
2.520.000	2.774.000
1.906.000	2.060.000
2.746.000	2.780.000
2.514.000	2.472.000
2.700.000	2.580.000
2.560.000	2.460.000
2.586.000	2.540.000
2.694.000	2.694.000
2.374.000	2.314.000
2.286.000	2.274.000
2.200.000	2.260.000
2.600.000	2.634.000
2.460.000	2.614.000
2.700.000	2.680.000
$\bar{x}_{20}$ 2.502.900	2.499.100
s $\pm$ 202.426	$\pm$ 194.273
v $\pm$ 8,1 %	$\pm$ 7,8 %

Tab. 8: Koloniezahl pro Gramm Futter nach einer Schüttelzeit von 120 min und 150 min. Mittelwerte der 20 Versuchsansätze der Versuchsreihe Nr. 7

WERNERY 1971 und WERNERY und HILLIGER 1973 errechnen aus ihren Untersuchungen einen Variationskoeffizienten von $v = \pm 29,3 \%$ bzw. von $v = \pm 29,1 \%$. Ihre Variationskoeffizienten liegen damit etwa $2 \frac{1}{2}$ mal so hoch wie bei den eigenen Befunden. Bei WERNERY 1971 betrug das Verhältnis des kleinsten zum größten Wert 1: 4, während WERNERY und HILLIGER 1973 ein Verhältnis von 1: 2,4 angeben. Bei den in Tabelle 8 angegebenen Zahlen verhalten sich der größte zum kleinsten Wert wie 1 : 1,42.

Unterstellt man, daß die Einheitlichkeit der Untersuchungs- und Bewertungstechnik zwischen den genannten Autoren und den eigenen Untersuchungen als gleichwertig anzusprechen ist, so können die festgestellten Unterschiede hinsichtlich der Reproduzierbarkeit nur auf erhebliche Unterschiede in der Homogenität der Futtermischung in dem Sinne zurückgeführt werden, daß das von mir benutzte Futter eine überdurchschnittlich gute Gleichmäßigkeit der Mischung aufweist.

B. Der Einfluß der Stehzeit

In den Versuchsreihen Nr. 1 und 2 wurden die bei der Versuchsanlage vorausgesetzten Gegebenheiten über das Auftreten eines Keimnachweisplateaus und über den Einfluß der Absetzdauer für das als Modell benutzte Schweinemast-Alleinfutter I überprüft. Das Plateau des Keimnachweises ließ sich nach einer Schüttelzeit von 90 bis 120 min ermitteln. Als optimale Absetzdauer ergab sich eine Zeit von 10 min. Die erhobenen Befunde bestätigen damit die Angaben von WERNERY 1971 und WERNERY und HILLIGER 1973.

Die Befunde der 4 Versuchsreihen über den Einfluß der Stehzeit auf den Keimnachweis (Versuchsreihe Nr. 3 bis 6) werden im folgenden im Hinblick auf vier Fragen diskutiert:

1. Läßt sich auch bei Einfluß einer Stehzeit vor dem

Schütteln ein Keimnachweisplateau ermitteln?

2. Verkürzt sich durch die Stehzeit die notwendige Schüttelzeit bis zum Auftreten eines Keimnachweisplateaus?
3. Liegt das Keimnachweisplateau bei der Benutzung von Stehzeiten in der gleichen absoluten Höhe wie beim Schütteln ohne Stehzeit?
4. Unterscheidet sich die Lage des Keimnachweisplateaus bei den verschiedenen Stehzeiten?

Zur Erleichterung der Besprechung dieser Fragen sind die den Abbildungen 4, 5, 6 und 7 zugrunde liegenden Befunde in Abbildung 8 zusammengefaßt, wobei zur Verbesserung der Übersicht die Standardabweichungen nicht mit eingezeichnet wurden.

Zu Frage 1: Läßt sich auch bei Einschluß einer Stehzeit vor dem Schütteln ein Keimnachweisplateau ermitteln?

Bei den 3 Versuchsreihen Nr. 3, 4 und 5 mit einer Stehzeit von 1, 2 und 4 Stunden läßt sich nach einer zweistündigen Schüttelzeit ein Keimnachweisplateau sicher nachweisen. Bei der Versuchsreihe Nr. 6 mit einer Stehzeit von 6 Stunden vor dem Schütteln läßt sich dagegen die Ausbildung eines Keimnachweisplateaus nicht feststellen. Hier steigt die nachgewiesene Keimzahl bis zum Abschluß der Schütteldauer kontinuierlich an, ohne jedoch deutlich erkennen zu lassen, daß ein Bereich exponentialer Keimvermehrung erreicht wird. Trotzdem wird die Ansicht vertreten, daß bei Versuchsreihe Nr. 6 eine Plateaubildung des Keimnachweises nicht zustande kam, weil die durch die Schüttelung bedingte Ablösung der Keime von den Futterpartikeln bis in die Phase der beginnenden Keimvermehrung hineinreichte. Diese Meinung wird begründet mit der Tatsache, daß sich am Ende dieses Versuches das Futter 8 1/2 Stunden in der Suspensionsflüssigkeit befand und JERNERY 1971 bei seinen Versuchen ermittelte, daß es bereits zwischen 8 und 14 Stunden

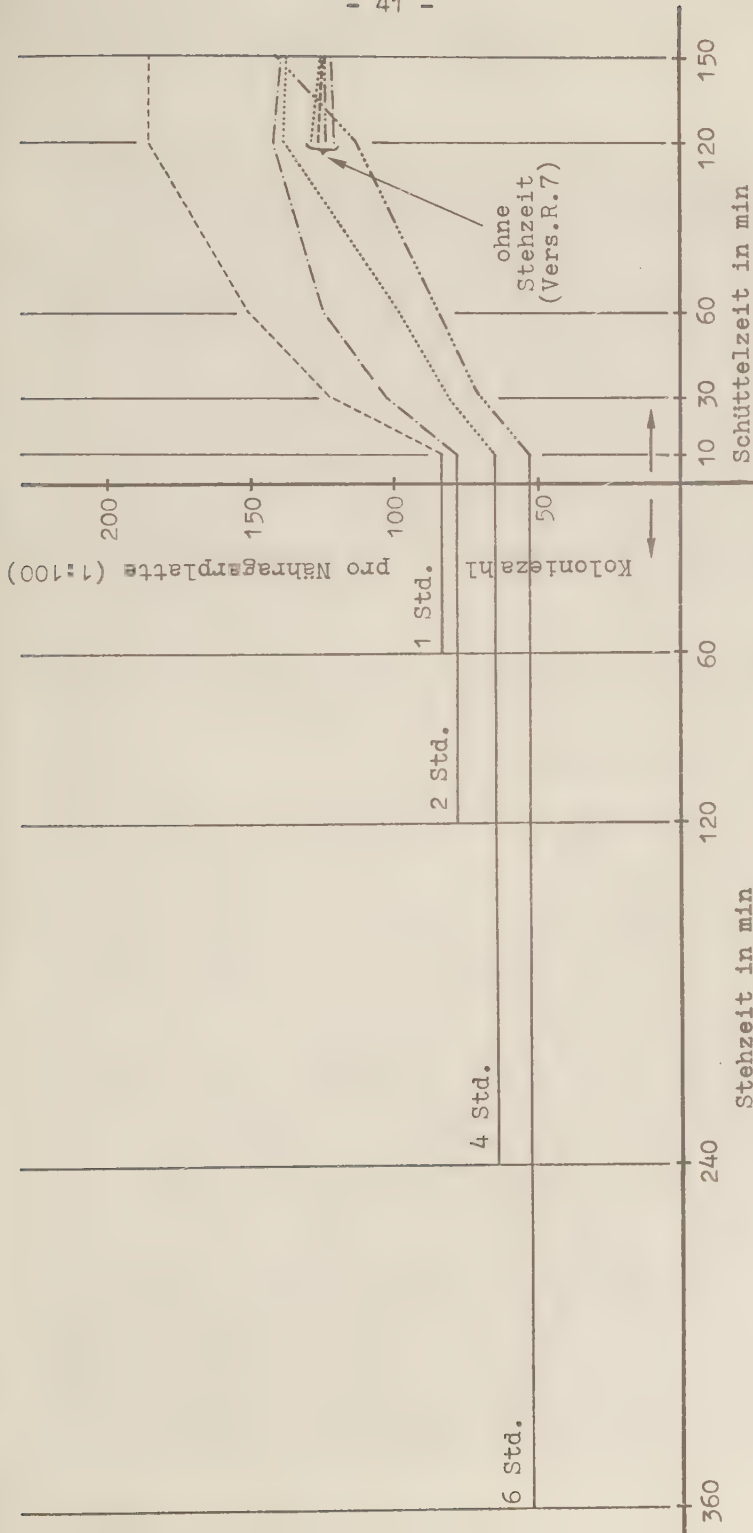


Abb. 8: Einfluß verschiedener Stehzeiten (Einweichzeiten) von 1, 2, 4 und 6 Stunden auf die nachweisbare Koloniezahl in Gegenüberstellung zum Schütteln ohne vorangegangene Stehzeit bei einem mehrlartigen Mischfuttermittel. Mittelwerte aus jeweils 5 Versuchsansätzen der Versuchsreihen Nr. 3 bis 6 und 7a bis 7d

der Einwirkung der Suspensionsflüssigkeit auf das Futter zu einer geringen Keimvermehrung kommt.

Zu Frage 2: Verkürzt sich durch die Stehzeit die notwendige Schüttelzeit bis zum Auftreten eines Keimnachweisplateaus? Die Planung der Versuchsreihen Nr. 3, 4, 5 und 6 ging davon aus, daß man durch vorangestellte einfache Stehzeit die Schüttelzeit reduzieren kann, die zum Erreichen des Keimnachweisplateaus notwendig ist. Die Richtigkeit dieser Überlegung ließ sich bei allen 4 Versuchsreihen nicht bestätigen. Trotz einer Stehzeitlänge zwischen 1 und 6 Stunden wurde in keiner der 4 Versuchsreihen eine Verkürzung der Schüttelzeit, die bis zum Erreichen des Keimnachweisplateaus notwendig ist, auf unter 120 min erreicht. Diese Schütteldauer ist für das untersuchte Futter gemäß den Versuchsreihen 1 und 2 zum Erreichen des Keimnachweisplateaus auch ohne eine vorangegangene Stehzeit erforderlich.

Bei dem geprüften Futter kann daher die notwendige Schüttelzeit zum Erreichen des Keimnachweisplateaus entgegen der Erwartung nicht durch die vorangestellte Stehzeit verkürzt werden. Als Erklärung für diesen Befund bin ich geneigt anzunehmen, daß einfaches Stehen in der Suspensionsflüssigkeit wenig bzw. nicht geeignet ist, die Ablösung der Mikroorganismen von den Futterpartikeln für nachfolgendes Schütteln zu erleichtern. Die mit Sicherheit eingeleiteten Quellungsvorgänge durch eine Stehzeit haben offenbar auf die Ablösungsbereitschaft der Mikroorganismen von den Futterpartikeln praktisch keinen Einfluß.

Vergleichbare Untersuchungen liegen in der Literatur zu diesem Fragenkreis meines Wissens nicht vor. Es erscheint daher notwendig, die von mir erhobenen Befunde über den Wert einer Stehzeit vor dem Schütteln an anderen Mischfuttermitteln zu überprüfen, bevor man ihnen eine allgemeine Bedeutung zusprechen kann.

Zu Frage 3: Liegt das Keimnachweisplateau bei der Benutzung von Stehzeiten in der gleichen absoluten Höhe wie beim Schütteln ohne Stehzeit? Wie Tabelle 7 ausweist, ergaben die zum Vergleich angesetzten Futterproben der Versuchsreihe Nr. 7 eine durchschnittliche Koloniezahl von 2.500.000 pro Gramm Futter, wobei dieser Mittelwert mit einem Variationskoeffizienten von $\pm 8,0 \%$ eine überraschend gute Einheitlichkeit aufweist. Unter Nichtbeachtung der Unterschiede im Anstieg und in der absoluten Höhe des Keimnachweises in den 4 Versuchsreihen Nr. 3 bis 6, ließen sich aus den 20 Versuchsansätzen folgende Mittelwerte $\bar{x}$ und Variationskoeffizienten v errechnen:

Schütteldauer 10 min $\bar{x} = 1.402.000$ $v = \pm 26,9 \%$

Schütteldauer 120 min $\bar{x} = 2.896.000$ $v = \pm 19,6 \%$

Schütteldauer 150 min $\bar{x} = 3.008.000$ $v = \pm 14,7 \%$

Die Mittelwerte der nach einer Stehzeit nachgewiesenen Koloniezahlen lagen demnach nach 10 min Schüttelzeit wesentlich unter den Befunden der Vergleichsuntersuchungen (Versuchsreihe Nr. 7), nach einer Schüttelzeit von 120 und 150 min jedoch deutlich über ihnen. Dabei liegen die Variationskoeffizienten in der Plateausituation etwa doppelt so hoch wie bei den Vergleichsproben und nach einer ganz kurzen Schüttelzeit sogar beim dreifachen Wert. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % ließ sich die Signifikanz des festgestellten Unterschiedes des Keimnachweises im Plateau zwischen der Versuchsreihe Nr. 7 gegenüber den Versuchsreihen Nr. 3 bis 6 bestätigen.

Über die Ursachen dieses Unterschiedes können keine sicheren Aussagen gemacht werden. Es scheint nicht abwegig, aus der Versuchstechnik dazu folgende Erklärung zu geben: Bei der Durchführung der Versuchsreihen Nr. 3 bis 6 wurde die Schütteldauer bis zu 120 min 3 mal für 1 min unterbrochen und anschließend jeweils 10 ml der Keimsuspension in ein Reagenzglas überpipettiert. In der

Zeit bis zum Erreichen des Keimnachweisplateaus hat sich bis dahin das zunächst angesetzte Verhältnis von 10 g Futter auf 200 ml Suspensionsflüssigkeit in dem Sinne verschoben, daß praktisch die gleiche Futtermenge in einer um 15 % kleineren Flüssigkeitsmenge aufgeschwemmt wird. Bei dieser Verschiebung ist allerdings zu bedenken, daß bei der dreimal 10 ml Flüssigkeitsentnahme auch bereits abgelöste Keime mit entfernt wurden. Da die Ablösung aber noch unvollständig war - zur überschläglichen Kalkulation könnte man etwa $\frac{2}{3}$ annehmen - kommt es zu einer relativen Keimanreicherung in der Suspensionsflüssigkeit bei Fortführung der Schüttelung bis zum Erreichen des Plateaus, so daß die folgenden Abimpfungen einen erhöhten Nachweis erbringen müßten. Um den Umfang dieses Anstiegs zu ermitteln, wird folgende Überlegung angestellt: In 10 g Futter sind $10 \times 2,5$ Millionen Keime enthalten. Bei 200 ml Flüssigkeit befinden sich im Nachweisplateau 125.000 Keime in einem ml. In 30 ml wären es mithin 3,75 Millionen Keime. Ist der Abwaschvorgang noch unvollständig -- z.B. $\frac{2}{3}$ des Maximums - so reichert sich die verbleibende Flüssigkeit zusätzlich um 1,2 Millionen Keime an. Verteilt auf 170 ml ergibt dies 7.055 Keime pro ml. Bei einem Normalgehalt im Plateau von 125.000 Keimen/ml entspräche dies einer Zunahme um + 5,55 %.

Der tatsächliche Unterschied der Keimausbeute im Bereich des Nachweisplateaus errechnet sich mit 14,1 %. Die erläuterte Verschiebung der Quantitäten durch die Mehrfachentnahmen reicht offenbar zur Begründung des festgestellten Unterschiedes der Nachweisleistung nicht aus. Daher wurde als nächste Frage analysiert, ob Nachweisunterschiede zwischen den verschiedenen Stehzeiten ermittelt werden können.

Es ist in diesem Zusammenhang zu überlegen, ob man bei weiteren Untersuchungen über den Einfluß der Stehzeiten die von mir gewählte Versuchstechnik so variiert, daß man die Zahl der Unterbrechungen der Schütteldauer so

klein wie möglich hält, d.h. eine Entnahme der Probe beispielsweise nur nach 90, 120 und 150 min Schütteldauer vornimmt. Damit ließe sich eine weniger ungünstige Verschiebung der Mengenverhältnisse von Futter zu Flüssigkeit im Probeansatz erreichen, die nach der skizzierten Kalkulation einen gewissen Einfluß auf das Gesamtergebnis zu nehmen scheint.

Zu Frage 4: Unterscheidet sich die Lage des Keimnachweisplateaus bei den verschiedenen Stehzeiten? Aus Abbildung 8 und Tabelle 7 ist zu erkennen, daß die verschiedenen Stehzeiten zwar nicht zu einer Verkürzung der zur Plateaubildung erforderlichen Schüttelzeit führen, daß sie aber offensichtlich auf die absolute Höhe der nachweisbaren Keimzahl einen steigernden Einfluß nehmen. Im vorangegangenen Abschnitt ist dies für den **D u r c h s c h n i t t** aller 4 Versuchsreihen über den Einfluß der Stehzeit dargelegt und die möglichen Ursachen erörtert worden.

Betrachtet man jedoch die Ergebnisse der 4 Versuchsreihen Nr. 4 bis 7 **e i n z e l n**, so zeigt sich eine deutliche Abstufung in dem Sinne, daß mit wachsender Verlängerung der Stehzeit die absolute Zahl der nachgewiesenen Kolonien kleiner wird. Diese Abstufung tritt nicht nur im Nachweisplateau, sondern weitgehend entsprechend auch in den drei davorliegenden Abimpfzeiten nach 10, 30 und 60 min Schüttelzeit auf. Nach 120 min Schüttelzeit ergibt sich rechnerisch folgende Relation des durchschnittlichen Keimnachweises:

ohne Stehzeit (n=20)	Versuchsreihe Nr. 7	100 %
1 Std. (n=5)	Nr. 3	146 %
2 Std. (n=5)	Nr. 4	112 %
4 Std. (n=5)	Nr. 5	109 %
6 Std. (n=5)	Nr. 6	89 %

Die hohe Nachweisleistung von 146 % nach 1 Stunde Stehzeit gegenüber der Versuchsreihe Nr. 7 kann mit dem im

Vorabschnitt dargelegten Überlegungen der Quantitätsverschiebung nicht befriedigend erklärt werden. Gegen eine solche Erklärung spricht auch der hohe Variationskoeffizient von $v = \pm 19,6\%$ für die Streuung der nach 120 min Schütteln erhobenen Befunde bei allen 4 Stehzeitversuchen und die Signifikanz des gefundenen Unterschiedes in der Koloniezahl zwischen einer Stehzeit von ein und zwei Stunden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 %.

Würde ausschließlich die Frage einer Verminderung des Keimnachweises durch die Benutzung von Stehzeiten zu beantworten sein, wäre daran zu denken, daß die in der Literatur beschriebenen Absterbeeffekte bei Einwirkungsverlängerung als Ursache in Frage kommen. Besonders aus den Untersuchungen von SPICHER 1967 ist allerdings bekannt, daß die Absterbeeffekte im hohen Maße von der Art der Suspensionsflüssigkeit abhängen, und daß die von mir benutzte Pepton-NaCl-Lösung bei einer Einwirkungsdauer von 2 Stunden nur zu einer ganz geringen Keimzahlverminderung führt. Untersuchungen über den Einfluß einer Pepton-NaCl-Lösung auf eine Keimsuspension über eine Einwirkungsdauer von 2 Stunden hinaus liegen meines Wissens in der Literatur nicht vor. Eine Wirkung im Sinne einer Keimnachweissteigerung bei der Futtermitteluntersuchung allein durch einfaches Verweilen im Sinne der benutzten Stehzeit wird in der Literatur nicht isoliert beschrieben, sondern nur im Zusammenhang mit einer folgenden Schüttelzeit als vorteilhaft genannt (HORTER und KLEIN 1969).

Die bei den eigenen Untersuchungen festgestellten Nachweisunterschiede lassen sich damit auf Grund der Literaturangaben nicht befriedigend erklären. Die eigenen Befunde gestatten allerdings auch nicht die Ableitung gesicherter Zusammenhänge. Die im folgenden skizzierte Erklärung für die erhobenen Befunde ist daher als Erklärungsversuch aufzufassen, der dazu beitragen möge, die Methodik der Futtermitteluntersuchungen verbessernd weiterzuentwickeln.

Es wird vermutet, daß sich bei den genannten Befunden zwei Effekte überlagern:

1. ein nachweissteigernder Effekt und
2. ein nachweisdämpfender Effekt.

Der nachweissteigernde Effekt wird durch eine kürzere Stehzeit vermutlich bis maximal 2 Stunden bewirkt. Er ist begründet in der schonenden Einleitung von Quellungs- und damit Stoffwechselaktivierungsvorgängen an den Mikroorganismen in dem bis zum Probeansatz trockenen Futter. Empfindlichere Keime sind durch diese schonend eingeleitete Reaktivierung besser in der Lage, die dann anschließende mechanische Ablösung von den Futterpartikeln zu überleben.

Der nachweisdämpfende Effekt ergibt sich durch eine längere Verweilzeit der Mikroorganismen in einem qualitativ mäßigen Nährmedium, wie es das Suspensionsmedium auch nach Aufnahme von löslichen Bestandteilen aus der Futterprobe darstellt. Nach einer Einwirkungszeit von etwa 2 bis 3 Stunden könnten empfindlichere Keime in steigendem Maße in solchem mäßigen Nährmedium ihre Vermehrungsfähigkeit verlieren und damit mit fortschreitender Verweilzeit zu einer wachsenden Minderung der kulturell nachweisbaren Koloniezahl führen.

Mit dieser Erklärung für die erhobenen Befunde würde die Stehzeit bei der mikrobiologischen Futteruntersuchung einen neuen methodischen Ansatz bieten, um den quantitativen Keimnachweis weiter zu optimieren. Eine Verkürzung der Schüttelzeit, die erforderlich ist, um das Nachweisplateau zu erreichen, scheint eine Stehzeit nicht zu bewirken, wohl aber den absoluten quantitativen Nachweis verbessern zu können. Bei dem festgestellten Steigerungseffekt durch eine kürzere Stehzeit erscheint es sinnvoll, weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet durchzuführen, um unsere Kenntnisse so zu verbessern, daß die Untersuchungsverfahren auf dem Gebiet der Futtermittelmikrobiologie einer Optimierung und Vereinheitlichung näher gebracht werden können.

IV. Z U S A M M E N F A S S U N G

Die vorgelegte Arbeit soll einen Beitrag zur Verbesserung der Kenntnisse über die Methodik der mikrobiologischen Untersuchung von Mischfuttermitteln leisten.

An e i n e r Charge eines mehlartigen Schweinemast-Meal-futter I nach DLG-Standard mit einem Keimgehalt von 2,5 Millionen Bakterien pro Gramm Futter wurde im besonderen der Einfluß der Stehzeit (Einweichzeit) auf die Schütteldauer und auf die nachweisbare Keimzahl geprüft. Folgende Ergebnisse wurden dabei erzielt:

1. Zum optimalen Keimnachweis ist bei dem geprüften Mischfutter eine Schüttelzeit von 120 min erforderlich. Erst nach dieser Zeit bildet sich ein Keimnachweis-Plateau aus.
2. Die Angabe von WERNERY 1971, daß nach der Schüttelung eine Absetzzeit von 10 min optimale Nachweisergebnisse bewirkt, konnte bestätigt werden.
3. Bei der benutzten Futtermittelcharge ließ sich bei 20 Probeentnahmen unter sorgfältiger Beachtung einheitlicher Untersuchungs- und Bewertungstechnik für die Gesamtkeimzahl ein Variationskoeffizient von $v = \pm 8,1 \%$ errechnen.
4. Eine Stehzeit von 1 bis 5 Stunden vor der Schüttelung ist n i c h t in der Lage, die Schüttelzeit, die zum Erreichen des Keimnachweisplateaus erforderlich ist, zu verkürzen.
5. Eine kurze Stehzeit unter 2 Stunden scheint in der Lage zu sein, den absoluten quantitativen Keimnachweis wesentlich zu verbessern.
6. Eine längere Stehzeit über 4 Stunden scheint zu einer Minderung des absoluten quantitativen Keimnachweises zu führen.
7. Mit einer Keimvermehrung ist bei Zimmertemperatur bei einer Verweilzeit einer Futterprobe bis zu 8 Stunden in der Suspensionsflüssigkeit nicht zu rechnen.
8. Es wird zur Diskussion gestellt, in Anlehnung an die Nomenklatur bei der bakteriologischen Wasseruntersuchung, auch bei der Futtermitteluntersuchung den Ausdruck "Gesamtkeimzahl" durch den Ausdruck "Koloniezahl" zu ersetzen.

V. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

ANONYM

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasseruntersuchung
Herausgegeben von der Fachgruppe Wasserchemie in der
(Gesellschaft Deutscher Chemiker)

Lose-Blatt-Sammlung, 3. Auflage, 6. Lieferung 1971
Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstraße (1960)

ARBEITSGEMEINSCHAFT FÜR GETREIDEFORSCHUNG

Standardmethoden für Getreide, Mehl und Brot;
4. Auflage

M. Schäfer Verl., Detmold (1964)

CLAUS, G.

Mikroskopische und biologische Untersuchung von
Futtermitteln in: Herrmann, R. Handbuch der land-
wirtsch. Versuchs- und Untersuchungsmethodik
(Methodenbuch), Band 3

Neumann Verl., Neudamm u. Berlin (1941)

EMMERLING, A.

Prüfung der Futtermittel auf Unverfälschtheit und
Verdorbenheit

Landwirtsch. Versuchsstat. 37, 38-44 (1890)

EMMERLING, A.

Über die Bestimmung der "Frische" von Futtermitteln

Landwirtsch. Versuchsstat. 52, 25-34 (1899)

FURNESS, G.

Some factors affecting the destructions of *Bacterium*
coli by shaking glass beads

J. Gen. Microbiol. 7, 335-339 (1952)

GEDER, Brigitte

Futtermittelverderb durch Bakterien und Pilze und
seine nachteiligen Folgen

Übers. Tierernährg. 1, 45-56 (1973)

GORDAN, P.

Bakteriologische Untersuchungen zur Beurteilung von
Kleien nach ihrer Neigung zur Schimmelbildung
Landwirtsch.Versuchsstat. 60, 73-102 (1904)

HABS, H., Gertrud MÜLLER u.Mitarb.

Die neuen Einheitsverfahren für die bakteriologische
Wasseruntersuchung
Städtehygiene 23, 131-134 (1972)

HILLIGER, H.G.

Zur Problematik der bakteriologischen Futtermittel-
untersuchung und -beurteilung
Kraftfutter 52, 371-374 (1969)

HIRTE, W.F.

Einige Untersuchungen zur Methodik der mikrobiolo-
gischen Bodenprobenverarbeitung
Zbl.Bakt.Hyg.,II,Abt. 115, 394-403 (1962)

HONCAMP, F., SACHSSE, M. u. G. CLAUS

Bakteriologische, chemische und mikroskopisch-
biologische Untersuchungen von Futterstoffen tieri-
scher Herkunft
Z.Tierzüchtg. 25, 173-205 (1932)

HÖRTER, R.

Kulturelle Keimzählung an pelletierten Futtermittel-
proben
Zbl.Bakt.Hyg.,I.Abt.Orig. 207, 248-253 (1968)

HÖRTER, R.

Erfahrungen aus bakteriologischen Untersuchungen
von pelletierten Futtermittelproben
Kraftfutter 52, 650-652 (1969)

HÖRTER, R.

Untersuchungen über Keimzahl und -zusammensetzung an im Handel befindlichen Pellet-Futtern für Ratten und Mäuse

Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 85, 274-275 (1972)

HÖRTER, R.

Vergleichende orientierende Untersuchungen über Keimzahl und Keimzusammensetzung von im Handel erhältlichem Pelletfutter für Hunde

Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 85, 369-370 (1972)

HÖRTER, R. u. H. KLEIN

Untersuchungen über die Eignung verschiedener Verdünnungsflüssigkeiten und Kulturverfahren für die kulturelle Keimzählung an pelletierten Futtermittelpuben

Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig. 211, 248-252 (1969)

JUHR, N.-C. u. F. GRUBER

Untersuchungen an Futtermitteln für SPF-Tiere. Einfluß des Restkeimgehaltes eines pasteurisierten Futters auf Darmflora und Resistenz

Z.Versuchstierk. 13, 267-274 (1971)

JUHR, N.-C. u. S. OBI

Untersuchungen von Futtermitteln für SPF-Versuchstiere. Restkeimgehalt in pasteurisierten Versuchstierfuttern

Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 83, 280-281 (1970)

KRUGER, R. u. E. STEFFECK

14. Hauptversammlung des Verbandes in München

Landwirtsch.Versuchsstat. 54, 40-47 (1900)

RINCKLEBEN, P. u. H. BARTRAM

Bedeutung bakteriologischer Futtermitteluntersuchungen

Z.Tierernährung 6, 33-42 (1943)

SCHMIDT, H.L.

Bemerkungen zur Vereinheitlichung der Keimzählung
bei der Untersuchung von Futtermitteln
Landwirtschaft.Forsch. 16, 51-64 (1963)

SCHMIDT, H.L.

Über Keimbesatz und Keimverunreinigung von Handels-
futtermitteln
Getreide Mehl 15, 28-34 (1965)

SCHMIDT, H.L.

Zum Keimgehalt von Preßfuttermitteln
Referat Wien (1967)

SCHMIDT, H.L.

Zur Mikrobiologie der Handelsfuttermittel
Landwirtschaft.Forsch. 21, 146-163 (1968)

SINELL, H.J., REUTER, G. u. F. UNTERMANN

Zur Standardisierung der aeroben Gesamtkeimzahlbe-
stimmung in Fleisch und Fleischerzeugnissen.
I. Mitt.: Prüfung von verschiedenen Probezerklei-
nerungs- und -verdünnungsverfahren
Arch.Lebensmittelhyg. 17, 25-31 (1966)

SOXLETH

14. Hauptversammlung des Verbandes in München
Landwirtsch.Versuchsstat. 54, 40-47 (1900)

SPICHER, G.

Vergleichende Untersuchungen über die Mikroflora
des Getreides
Zbl.Bakt.Hyg.,II.Abt. 109, 589-610 (1956)

SPICHER, G.

Neue Untersuchungen über die Mikroflora des Getreides
Getreide Mehl 8, 57-63 (1958)

SPICHER, G.

Die Ermittlung des Keimgehaltes von Getreide und
Getreideprodukten und ihre Problematik
Brot Gebäck 16, 124-134 (1962)

SPICHER, G.

Neue Gesichtspunkte bei der Klassifizierung der Bak-
terienflora des Getreides und der Getreideprodukte
Bericht über die Getreidechemiker-Tagung vom
28.-30.5.1963 in Detmold S.93-106

SPICHER, G.

Beiträge zur Vereinheitlichung der Ermittlung des
Keimgehaltes von Getreide und Getreideprodukten
Getreide Mehl 17, 85-89 (1967)

UNTERMANN, F.

Einfluß verschiedener Verdünnungstechniken auf die
Ergebnisse der Keimzahlbestimmung in Fleisch und
Fleischerzeugnissen
Arch.Lebensmittelhyg. 28, 254-258 (1967)

WERNERY, U.

Einfluß der Schüttelart, Schüttelzeit und Absetz-
zeit auf die Zahl der nachweisbaren Keime bei der
mikrobiologischen Untersuchung von Mischfuttermitteln
Vet.med.Diss. Berlin FU (1971)

WERNERY, U. u. H.G. HILLIGER

Beitrag zur Technik und Bewertung der Keimzahlbe-
stimmung bei mehlartigen Futtermitteln
Landwirtschaft.Forsch. 26, 110-117 (1973)

Herrn Prof. Dr. H. G. Milliger möchte ich herzlich für die Überlassung der Arbeit, für seine Anregungen und Unterstützungen bei der Planung und Durchführung meiner Versuche und bei der Abfassung dieser Dissertation danken.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern des Instituts für ihren Rat und ihre großzügige Hilfe.

LEBENS LAUF

- 21.9.1941 geboren als Sohn des Zahnarztes
Dr. Josef Bielan und der Ärztin
Dr. Irmgard Bielan geb. Malek,
in Mähr.-Ostrau,
- 1959 Abitur,
- 1959 bis 1961 Studium der Medizin an der
Karl-Marx-Universität Leipzig,
- 6.8.1961 Flucht nach Westdeutschland,
- 1965 bis 1971 Studium der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin
- 1968 Physikum,
- 9.6.1971 III. Abschnitt der Tierärztlichen
Prüfung,
- 30.6.1971 Approbation als Tierarzt,
- 1.8.1971 bis 15.10.1972 Assistent an der Kleintier-
Klinik des Tierärztlichen
Instituts der Universität
Göttingen,
- 16.10.1972 bis 31.5.1973 Wissenschaftlicher Mitarbeiter
in der Fachrichtung Tierhygiene
des Fachbereichs Veterinär-
medizin der FU Berlin

